

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

VALIDATION DE L'INJECTION D'HÉMINE, CHEZ LA SOURIS, COMME UN MODÈLE  
POUR ÉTUDIER LES EFFETS SUR LES CELLULES OSSEUSES

MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR  
NILSON JESUS QUINTANA

MARS 2014

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## REMERCIEMENTS

D'abord, j'aimerais remercier Dieu et ma famille.

J'aimerais aussi adresser mes remerciements aux personnes qui m'ont apporté de l'aide pendant mon parcours comme étudiant de la maîtrise en biologie. Je tiens à remercier mes deux directeurs, Dr Tatiana Scorza et Dr Robert Moreau, qui m'ont donné du soutien avec leurs inestimables connaissances, leur patience et leur disponibilité. Mes remerciements s'adressent également à Jaime Sanchez pour sa collaboration et à d'autres collègues du laboratoire, Diane, Ester, Véronique, Hugo, Corine, Olha, Rachel, Abdallah, qui chacun à sa manière, a contribué au cours de la réalisation de ma maîtrise.

Merci à tous,

Nilson Jesus Quintana Chaparro

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	vii
LISTE DES SYMBOLES.....	ix
RÉSUMÉ.....	x
PROBLÉMATIQUE.....	xii
CHAPITRE I	
ÉTAT DES CONNAISSANCES.....	1
1. 1 INTRODUCTION.....	1
1. 1. 1. L'anémie et l'hémolyse.....	1
1. 1. 1. 1. La thalassémie.....	1
1. 1. 1. 2. L'anémie falciforme.....	2
1. 1. 2. Catabolisme de l'hémoglobine (Hb) de l'hème.....	2
1. 1. 2. 1. L'haptoglobine et le catabolisme d'hémoglobine (Hb) libre.....	3
1. 1. 2. 2. L'hème oxygénase.....	4
1. 1. 2. 3. Autres mécanismes éboueurs d'hémoglobine/hème.....	7
1. 1. 3. L'ostéoporose associée à l'anémie.....	8
1. 1. 3. 1. Métabolisme osseux.....	8
1. 1. 3. 1. 1. Tissu osseux.....	9
1. 1. 3. 1. 2. Les ostéoclastes.....	9
1. 1. 3. 1. 3. Les ostéoblastes.....	10
1. 1. 3. 1. 4. Le remodelage osseux.....	10
1. 1. 3. 2. Stress oxydatif et métabolisme osseux.....	12
1. 1. 3. 3. La régulation du remodelage osseux par la HO-1.....	13
1. 2. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS.....	15
CHAPITRE II	
DÉMARCHE MÉTHODOLOGIQUE.....	16

2. 1. MATÉRIEL & MÉTHODES.....	16
2. 1. 1. Volets <i>in vivo</i> et <i>ex-vivo</i> .....	16
2. 1. 1. 1. Cultures cellulaires à partir des cellules de la moelle osseuse de souris BALB/c injectées ou non avec l'hémine (HE).....	16
2. 1. 1. 2. Marquage des précurseurs des ostéoclastes.....	17
2. 1. 2. Volet <i>ex-vivo</i> .....	18
2. 1. 2. 1. Formation d'ostéoclastes à partir des cellules de la moelle osseuse de souris BALB/c exposées à l' hémine (HE).....	18
2. 1. 2. 2. Effet d'un traitement <i>in vitro</i> avec de l'hémine ( HE) sur les fonctions de lignées d'ostéoblastes.....	18
2. 1. 2. 2. 1. Détermination de la viabilité des lignées ostéoblastiques traitées avec de l' hémine (HE)....	19
2. 1. 2. 2. 2. Mesure de l'activité phosphatase alcaline.....	19
2. 1. 2. 2. 3. Dosage de protéines.....	20
2. 1. 2. 2. 4. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) et immunobuvardage pour la détection de la HO1.....	20
2. 1. 2. 2. 5. Production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les lignées ostéoblastiques exposées à l'hémine (HE).....	22
2. 1. 3. Analyses statistiques.....	22
2. 2. RÉSULTATS.....	23
2. 2. 1. Ostéoclastogenèse à partir de précurseurs cellulaires exposés <i>in vivo</i> à l'hémine (HE).....	23
2. 2. 2. L'analyse phénotypique des précurseurs des ostéoclastes dans la moelle osseuse.....	24
2. 2. 3. Ostéoclastogenèse à partir de précurseurs de la moelle exposés <i>in vitro</i> à l'hémine (HE) .....	26
2. 2. 4. Formation de colonies mésenchymales (précurseurs des ostéoblastes) à partir de la moelle de souris injectées avec l'hémine (HE).....	27
2. 2. 5. Effet de l'hémine (HE) <i>in vitro</i> sur la viabilité de deux lignées	

ostéoblastiques.....	28
2. 2. 6. Effet de l'hémine (HE) sur l'activité phosphatase alcaline dans les lignées ostéoblastiques.....	29
2. 2. 7. Évaluation de l'expression de HO-1 après exposition à l'hémine (HE).....	30
2. 2. 8. Production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) chez les lignées ostéoblastiques exposées à l'hémine (HE).....	31
CHAPITRE III	
DISCUSSION & CONCLUSION.....	32
3. 1. DISCUSSION.....	32
3. 2. CONCLUSION.....	39
BIBLIOGRAPHIE.....	40

## LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Mécanismes de défense et élimination de l'hémoglobine (Hb) et de l'hème lors de l'hémolyse .....	5
1.2 Catabolisme de l'hème par l'hème oxygénase 1 (HO-1).....	6
1.3 Le remodelage osseux.....	11
1.4 Effet de l'administration de phénylhydrazine sur la masse osseuse et les niveaux des marqueurs sériques du remodelage osseux chez des souris BALB/c.....	13
2.1 Différenciation des ostéoclastes à partir des cellules de la moelle osseuse des souris BALB/c contrôles (Ctrl) et injectées avec de l'hémine (HE).....	23
2.2 Analyse phénotypique des précurseurs d'ostéoclastes chez des souris BALB/c Ctrl et injectées avec de l'hémine (HE).....	25
2.3 Effet de l'hémine (HE) sur l'ostéoclastogenèse <i>in vitro</i> .....	25
2.4 Impact de l'hémine (HE) <i>in vivo</i> sur la formation <i>ex vivo</i> des colonies mésenchymales.....	26
2.5 Effet de l'hémine (HE) sur la viabilité des cellules ostéoblastiques MG63 et MC3T3 ( <i>in vitro</i> ).....	27
2.6 Effet de l'hémine (HE) sur l'activité phosphatase alcaline des lignées ostéoblastiques MG63 et MC3T3.....	28
2.7 Expression de l'hème-oxygénase (HO)- 1 chez les lignées ostéoblastiques MG63 et MC3T3 exposées à l'hémine (HE).....	29
2.8 Niveaux d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) chez les lignées ostéoblastiques MG63 et MC3T3 exposées à l'hémine (HE).....	30

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ALP	phosphatase alcaline
ADN	acide désoxyribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
BCA	acide bicinchoninique
BR	bilirubine
BV	biliverdine
CCPA	Conseil Canadien de Protection des Animaux
c-FMS	récepteur du facteur de stimulation de colonies de macrophages
CIPA	Comité institutionnel de protection des animaux
DMSO	diméthylsulfoxyde
Fe <sup>2+</sup>	fer sous forme ferreux
Fe <sup>3+</sup>	fer sous forme ferrique
GSH	glutathion réduit
Hb	hémoglobine
HE	hémine
Hp	haptoglobine
Hpr	protéine homologue de haptoglobine
HPx	hémopexine
HO-1	hème-oxygénase 1
IL	interleukine
IL-1	interleukine 1
IL-6	interleukine 6



IL-10	interleukine 10
M-CSF	facteur de stimulation de colonies de macrophages
MTT	bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
NF $\kappa$ B	facteur nucléaire kappa B
OCN	ostéocalcine
OPG	ostéoprotégérine
PBS	tampon phosphate salin
PHZ	phénylhydrazine
PNP	para-nitrophényl
PNPP	para-nitrophénylphosphate
PTH	hormone parathyroïdienne
RANK	récepteur activateur du ligand NF $\kappa$ B
RANKL	ligand du RANK
ROS	espèce réactive d'oxygène
rpm	rotation par minute
SOx	stress oxydatif
TNF	facteur de nécrose tumorale
$\alpha$ MEM	«Minimum essential medium alpha»

## LISTE DES SYMBOLES

<i>cellules/mL</i>	cellules par millilitre
<i>g/dL</i>	gramme par décilitre
<i>M</i>	molaire
<i>mg/mL</i>	milligramme par millilitre
<i>mg/kg</i>	milligramme par kilogramme
<i>ng/mL</i>	nanogramme par millilitre
<i>nm</i>	nanomole
<i>Unités/mL</i>	unités par millilitre
<i>V</i>	volt
<i>%</i>	pourcentage
<i>°C</i>	degré celsius
<i>µg/mL</i>	microgramme par millilitre
<i>µM</i>	micromolaire

## RÉSUMÉ

La majorité des patients souffrant de  $\beta$ -hémoglobinopathies développent de l'ostéoporose. Dans ces maladies, une production d'hémoglobine (Hb) anormale provoque la lyse prématurée des érythrocytes, ce qui induit un stress hématopoïétique au niveau de la moelle osseuse. L'hypothèse la plus acceptée pour expliquer les altérations du tissu osseux associées à ces pathologies propose que le stress hématopoïétique conduit à une hyperplasie de la moelle osseuse et inhibe le métabolisme osseux. Nous proposons que l'hème, un oxydant puissant libéré lors de l'hémolyse, affecte aussi la physiologie des ostéoblastes et des ostéoclastes. Cette hypothèse s'appuie sur nos résultats préliminaires montrant que l'anémie hémolytique induite chez des souris infectées avec le parasite *Plasmodium chabaudi adami* ou par injection intra-péritonéale de phénylhydrazine, entraîne une perte rapide de la masse osseuse, et diminue l'expression des marqueurs plasmatiques de résorption et de formation osseuses. Ces résultats suggèrent que l'hémolyse modifie l'activité des ostéoclastes et/ou des ostéoblastes, cellules impliquées dans le remodelage de l'os. Notre étude avait comme objectif d'utiliser un modèle d'administration d'hème ferrique (hémine, HE) chez la souris Balb/c femelle et d'évaluer l'ostéoclastogenèse *ex vivo*, et corroboré les résultats *in vitro*. Nous avons aussi comme objectif d'étudier l'impact de l'HE sur la viabilité des lignées cellulaires ostéoblastiques (MC3T et MG63), leur capacité à exprimer l'enzyme anti-oxydante hème oxygénase-1 (HO-1) et leurs niveaux d'espèces réactives d'oxygène (ROS). Nos résultats confirment que l'HE *in vivo* amène une diminution significative du nombre d'ostéoclastes différenciés, ainsi qu'une réduction du nombre des précurseurs dans la moelle osseuse. De plus, nous avons observé une réduction du nombre de colonies de cellules mésenchymateuses provenant des cellules de la moelle des souris injectées avec l'HE. Chez les lignées ostéoblastiques, l'HE a diminué la viabilité cellulaire et l'activité de la phosphatase alcaline (ALP), en plus d'induire l'expression d'HO-1 chez les deux lignées cellulaires et la production de ROS. Dans l'ensemble, nos résultats confirment une modification importante de la physiologie des cellules de l'os par l'HE.

**Mots clés :** Hémine, ostéoblastes, ostéoclastes, stress oxydatif.

## PROBLÉMATIQUE

L'anémie hémolytique est définie comme une condition dans laquelle le nombre d'érythrocytes en circulation chute dû à leur lyse prématurée et dans des proportions qui dépassent leur remplacement. Ces conditions peuvent être héréditaires ou déclenchées par des mécanismes immunitaires, des infections (malaria), des hémorragies aiguës suite à des traumatismes, des lésions induites par des drogues ou d'autres agents chimiques. Le renouvellement des érythrocytes manquants a lieu dans la moelle osseuse, dans une tentative de maintenir la production d'érythrocytes prématurément détruits, ce qui conduit à une hyperplasie de cet organe hématopoïétique primaire. Cette hyperplasie est souvent mentionnée comme étant à l'origine du développement de l'ostéoporose. La destruction des érythrocytes entraîne une augmentation des niveaux d'hème libre (oxydé par la suite en hème ferrique ou hémine, HE) dans l'organisme. L'HE est une molécule hautement oxydante, qui induit la production des espèces réactives d'oxygène (ROS) et déclenche un stress oxydatif (SOx). Les patients avec des maladies comme la beta-thalassémie et l'anémie falciforme, caractérisées par la perte constante d'érythrocytes, développent de l'ostéoporose (Baldanzi et al., 2011 ; Sarrai et al., 2007), et cette pathologie osseuse est aussi associée à des SOx (Walter et al., 2006). En conditions normales, l'HE libérée par la lyse des érythrocytes est catabolisée en biliverdine, en monoxyde de carbone (CO), et en fer ( $\text{Fe}^{2+}$ ) par l'enzyme HO-1. Il est aussi connu que l'activité des cellules chargées du remodelage de l'os, les ostéoclastes et ostéoblastes est modulée par l'activité de l'HO-1 (Lin et al., 2010 ; Zwerina et al., 2005) et ces cellules sont aussi sensibles au SOx (Almeida et al., 2010; Sánchez-Rodriguez et al., 2007; Srinivasan et al., 2010). Ainsi, nous émettons l'hypothèse que l'HE libre pourrait être responsable des altérations du métabolisme osseux. Le présent projet vise à documenter les effets de l'HE sur la différenciation des ostéoclastes *in vivo/ex-vivo* et *in vitro*, ainsi que la viabilité, le potentiel de différenciation des ostéoblastes et l'expression de la HO-1 comme réponse de protection chez les ostéoblastes.

## CHAPITRE I

### ÉTAT DES CONNAISSANCES

#### 1. 1. INTRODUCTION

##### 1. 1. 1. L'anémie et l'hémolyse

L'anémie est une condition d'importance en santé publique, et affecte un nombre élevé de personnes dans le monde (WHO, 2002). L'organisation mondiale de la santé (OMS) définit l'anémie comme toute condition associée à une concentration d'Hb inférieure à 12 g/dl chez les femmes et à 13 g/dl chez les hommes (WHO 2001). L'anémie hémolytique comprend un groupe de troubles hémolytiques intravasculaires et extravasculaires qui provoquent la diminution du nombre des érythrocytes en circulation. Contrairement à l'anémie non-hémolytique (due à une carence en fer par exemple), le taux de survie des érythrocytes dans le sang périphérique (entre 90 et 120 jours chez l'être humain) est diminué dans l'anémie hémolytique. Il existe plusieurs types d'anémies hémolytiques et ces dernières sont classées selon la cause de la destruction prématurée des érythrocytes. Le défaut peut être au niveau des érythrocytes eux-mêmes et associé à des anomalies de l'hémoglobine (Hb) ( $\beta$  hémoglobinopathies). Aussi, l'hémolyse peut être causée par des facteurs extrinsèques tels une réponse anormale du système immunitaire, la formation de caillots dans les petits vaisseaux sanguins, certaines infections et les effets secondaires de certains médicaments (céphalosporines, anti-inflammatoires non stéroïdes, la pénicilline et ses dérivés, phenazopyridine, quinidine, lévofloxacine) (Mintzer *et* Billet, 2009).

##### 1. 1. 1. 1. La thalassémie

La thalassémie constitue un groupe de maladies à large spectre qui se manifestent par de simples anomalies asymptomatiques jusqu'à une anémie sévère et fatale. L'Hb adulte se compose de quatre chaînes polypeptidiques : deux chaînes alpha ( $\alpha$ ) et deux chaînes beta ( $\beta$ ). Il existe deux copies du gène qui code pour les chaînes  $\alpha$  de l'Hb (HBA1 et HBA2), situées sur le chromosome 16 chez l'humain. Le gène codant pour les chaînes  $\beta$  (HBB) est situé sur

le chromosome 11. Chez des individus normaux, la synthèse de l' $\alpha$  globine est assurée par quatre gènes dont deux copies se retrouvent sur le chromosome 16. Ce génotype correspond à la nomenclature  $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ . La forme  $\alpha$  de la thalassémie peut provenir de la suppression de l'expression de l'un ( $-\alpha$ ) ou des deux gènes ( $-/-$ ) du chromosome. À d'autres occasions, des mutations ponctuelles dans des régions critiques peuvent provoquer la synthèse de protéines non fonctionnelles et le génotype est désigné  $\alpha^T\alpha$  (Harteveld *et* Higgs, 2010). Cette forme de globine  $\alpha$  entraîne un excès de chaînes  $\beta$  et correspond à une anémie non-hémolytique qui est associée à un transport déficient de l'oxygène et à l'hypoxie. De façon réciproque, dans la  $\beta$ -thalassémie, des mutations peuvent être responsables de la suppression de l'expression des chaînes  $\beta$ , en altérant les sites d'épissage et en empêchant la suppression des introns, et des mutations dans le site accepteur de poly-A qui affectent la maturation et la stabilité de l'ARNm. Dans ce cas, l'excès de chaînes  $\alpha$  forme des agrégats insolubles qui s'attachent à la membrane des érythrocytes et causent leur lyse, provoquant l'anémie hémolytique (Galanello *et* Origa, 2010).

#### **1. 1. 1. 2. L'anémie falciforme**

L'anémie falciforme est une maladie héréditaire qui se caractérise par l'altération de l'Hb. L'allèle S est une version anormale du gène codant pour la chaîne  $\beta$  de l'Hb. Cette mutation est responsable de la synthèse de chaînes  $\beta$  dont un acide glutamique en position 67 est remplacé par une valine. L'Hb qui en résulte, appelée HbS (hémoglobine S pour « Sickle-cell disease », dénomination anglaise de la maladie), possède la structure  $\alpha_2\beta_2S$ , et se distingue de l'Hb A normale, par sa mobilité électrophorétique plus lente, mais surtout par l'insolubilité de sa forme désoxygénée, qui cristallise facilement. Cela forme de longues fibres qui déforment l'érythrocyte en lui faisant perdre son élasticité. Ces érythrocytes déformés vont obstruer les capillaires et provoquer une ischémie par manque d'apport d'oxygène dans les tissus plus affectés. Les érythrocytes affectés sont plus fragiles et leur rupture conduit à l'anémie de type hémolytique (Kohne, 2011).

#### **1. 1. 2. Catabolisme de l'hémoglobine (Hb) de l'hème**

Tel que décrit ci-dessus, les maladies hémolytiques se caractérisent par une destruction importante des érythrocytes. Dans des conditions normales, seulement 10-20%



des érythrocytes subissent une hémolyse et libèrent de l'Hb. En condition normale, l'Hb se trouve essentiellement à l'intérieur des globules rouges (13.5 à 17.5 g/dl chez l'homme et 12.5 à 15.5 g/dl chez la femme). À l'extérieur de l'érythrocyte, l'Hb est toxique dû à la capacité de ses groupes hème à participer à des réactions chimiques qui entraînent la génération de radicaux libres.

L'Hb humaine est constituée de quatre chaînes identiques deux à deux : deux chaînes  $\alpha$  de 141 acides aminés chacune et deux chaînes  $\beta$  de 146 acides aminés chacune. Chaque chaîne est associée à un groupement prosthétique, l'hème. L'hème est composé d'un cycle hétérogène porphyrrique (noyau tétrapyrrolique) et d'un atome de fer sous forme d'ion, qui est le site de fixation de l'oxygène. Physiologiquement, l'Hb contenue dans les érythrocytes sénescents est éliminée par les macrophages. Les érythrocytes mourants expriment fortement des molécules telles que la phosphatidylsérine sur le feuillet externe de la membrane plasmique (phénomène connu comme eryptosis), ce qui permet leur reconnaissance et leur élimination par phagocytose. Cette reconnaissance se fait par intermédiaire du récepteur  $\beta$ 2GP1 (Balasubramanian *et al.*, 1997), et l'internalisation et dégradation des érythrocytes sénescents se produisent de manière ordonnée sans provoquer une réponse inflammatoire (Föller *et al.*, 2008).

### 1. 1. 2. 1. L'haptoglobine et le catabolisme de l'hémoglobine (Hb) libre

Au cours du processus d'élimination des érythrocytes sénescents par les macrophages, la composante protéique de l'Hb est catabolisée en acides aminés pour être recyclés (Kumar *et* Bandyopadhyay, 2005). Le principal mécanisme d'internalisation et de dégradation de l'Hb libre lors de l'hémolyse implique les protéines plasmatiques : haptoglobine (Hp) et le récepteur éboueur des monocytes/macrophages CD163. L'Hp est une glycoprotéine abondante (0,45-3 mg/ml dans le plasma) produite par les hépatocytes. Les concentrations d'Hp dans le plasma augmentent au cours de la phase aiguë d'inflammation suite à une réponse aux interleukines (IL) pro-inflammatoires (IL-6 et IL-1) (Carter *et* Worwood, 2007). À l'opposé, les niveaux circulants d'Hp chutent radicalement lors des épisodes hémolytiques car le complexe Hb-Hp est internalisé et dégradé. Ce complexe est reconnu par les monocytes et macrophages, qui expriment le récepteur CD163. L'expression de ce récepteur est régulée par les IL-6 et IL-10. Une fois internalisées par les phagocytes, les

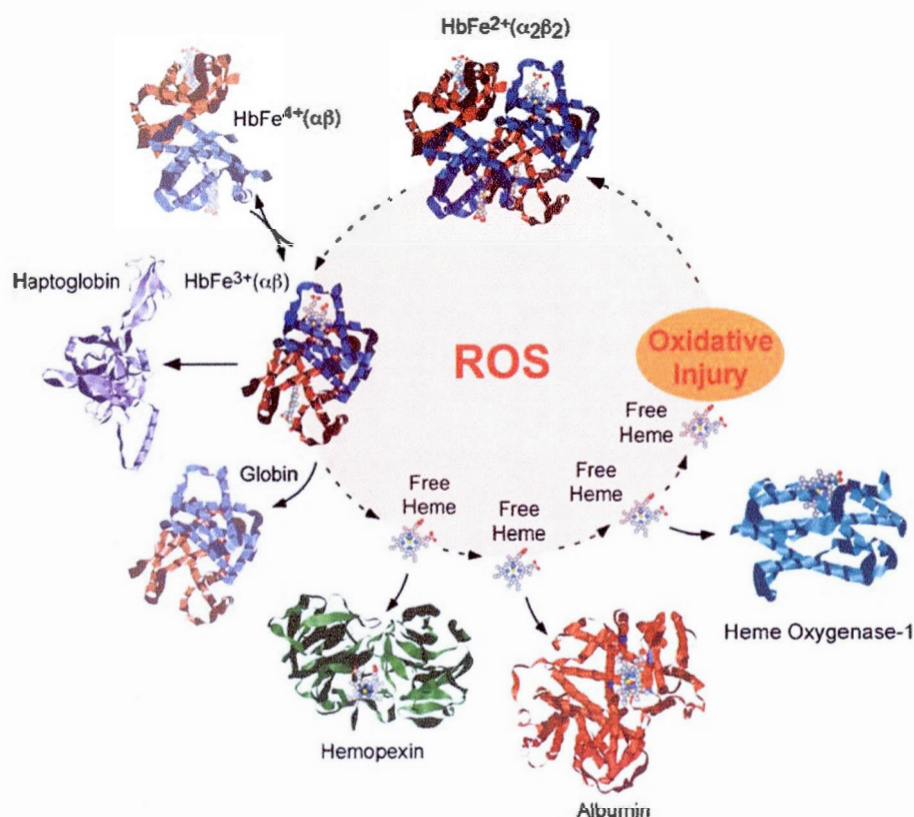
molécules de globines sont dégradées dans les lysosomes et l'hème libéré est dégradé en composés moins toxiques par l'HO-1 cytosolique (Nielsen *et al.*, 2010) (Figure 1.1).

#### 1. 1. 2. 2. L'hème oxygénase

L'HO est une enzyme ayant un rôle majeur contre le SOx induit par l'hème. Cette enzyme décompose l'anneau porphyrinique pour produire des quantités équimolaires de biliverdine (BV), de fer libre ( $\text{Fe}^{2+}$ ) et de monoxyde de carbone (CO). La bilirubine (BR) insoluble produite à partir de BV par la biliverdine réductase, est libérée dans le plasma par les macrophages, où elle est captée par l'albumine, pour ensuite être acheminée via la circulation sanguine au foie et ensuite internalisée par les hépatocytes, où elle est rendue soluble par conjugaison avec une molécule d'acide glucuronique. Ce complexe est ensuite excrété dans la bile (Sarady-Andreews *et al.*, 2005).

À ce jour, trois isoformes de HO ont été identifiées (HO-1, HO-2 et HO-3). Ce sont des produits de différents gènes et la régulation de leur expression diffère grandement entre les différents types de cellules, et selon les tissus. L'isoforme HO-1 fonctionne comme une réponse antioxydante et est directement impliqué dans la dégradation de l'hème (Figure 1.2). Les isoformes HO-2 et HO-3 fonctionnent comme première ligne de défense contre les agressions oxydatives/inflammatoires. L'isoforme HO-2 est fortement exprimé dans le cerveau et les testicules, et protège les neurones contre le SOx (Regan *et al.*, 2004).

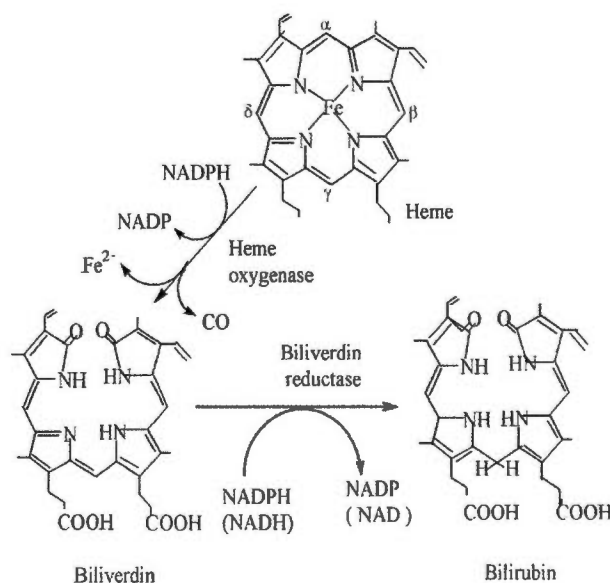




**Figure 1.1 : Mécanismes de défense et élimination de l'hémoglobine (Hb) et de l'hème lors de l'hémolyse.** Les sous-unités (α<sub>2</sub>β<sub>2</sub>) de l'Hb libérée, qui contiennent le Fe<sup>2+</sup>, se désagrègent spontanément en dimères Hb (αβ). En présence de ROS, l'HbFe<sup>2+</sup> est oxydée en HbFe<sup>3+</sup> (metHb); la forme HbFe<sup>4+</sup> intermédiaire est également générée et cause une réponse inflammatoire. Dans des conditions homéostatiques, l'HbFe<sup>3+</sup> est captée par l'haptoglobine (Hp), mais au cours de l'hémolyse, l'Hp s'épuise et l'hème est libéré, une partie duquel est capté par hémopexine (HPx) et l'albumine. L'hème qui entre en contact avec les cellules est dégradé par l'HO-1. L'hème libre favorise la production de ROS qui exacerbe l'oxydation de l'HbFe<sup>2</sup>, conduisant finalement à des dommages oxydatifs (Ferreira et al 2008).

L'expression du gène codant pour l'HO-1 est fortement induite par l'hypoxie, le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), l'hème et l'épuisement de glutathion cellulaire. L'HO-1 joue un rôle clé dans les mécanismes antioxydants, cyto-protecteurs et anti-inflammatoires. La dégradation de l'hème par l'HO-1, les actions de signalisation du CO, les propriétés antioxydantes de la BV, BR, et la séquestration du fer libre par la ferritine sont considérés

comme des effets anti-inflammatoires déclenchés par la HO-1. La molécule de CO semble être responsable de la plupart des actions anti-inflammatoires de l'HO-1. Dans les macrophages, le CO inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires, tel le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Otterbein *et al.*, 2000).



**Figure 1.2 : Catabolisme de l'hème par l'hème oxygénase 1 (HO-1).** L'HO-1 catalyse la première étape de la dégradation oxydative de l'hème libre ce qui produit le CO, le fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>), et la BV. La BV formée par cette réaction est ensuite transformée en BR par la biliverdine réductase, et le Fe<sup>2+</sup> est rapidement capté par la ferritine et recyclé pour la synthèse de l'hème. Tirée de Kumar et Bandyopadhyay, 2005.

Le CO supprime également l'expression d'enzymes pro-inflammatoires, telles que l'oxyde nitrique synthase inductible et la cyclo-oxygénase-2 (Suh *et al.*, 2006). Les effets anti-inflammatoires de la BV se manifestent par une diminution de l'infiltration leucocytaire et la prolifération plus faible des cellules T (Ollinger *et al.*, 2007). La BR inhibe l'activation des cellules endothéliales par la suppression d'E-sélectine et l'expression de la molécule 1 d'adhésion des cellules vasculaires (Soares *et al.*, 2004). Les effets de BV/BR semblent associés à l'inhibition du facteur nucléaire kappa B (NF- $\kappa$ B), un facteur de transcription strictement nécessaire à la transcription des gènes pro-inflammatoires (Sarady-Andrews *et al.*, 2005). Le fer est une molécule extrêmement pro-oxydante qui peut induire de

l'inflammation et son action est limitée par la ferritine, une protéine induite par l'HO-1 qui séquestre le fer (Pae *et al.* 2009).

### 1. 1. 2. 3. Autres mécanismes éboueurs d'hémoglobine/hème

Une autre protéine plasmatique, la protéine homologue de l'Hp (Hpr), a été identifiée comme une protéine liant l'Hb. En raison de la plus forte concentration de l'Hp dans le sang par rapport à l'Hpr (40 µg/ml dans le sérum), la participation de l'Hpr est minimale dans des circonstances normales, mais dans le cas d'hémolyse massive, l'Hpr contribue à inactiver l'Hb sans amener pourtant à son internalisation par les monocytes/macrophages (Carter *et al.*, Worwood, 2007).

L'Hb libérée à la suite de la destruction des cellules du sang se brise spontanément en dimères (Hbαβ) qui, en présence de ROS, sont oxydés à l'état ferrique Fe<sup>3+</sup> (Winterbourn, 1985). Dans des conditions normales, l'Hb est capturée par l'Hp. Mais durant l'anémie hémolytique, les quantités d'Hp décroissent fortement, et une portion de l'hème est libre dans le plasma (Carter *et al.*, Worwood, 2007). L'hème libre est capté avec une grande affinité par l'hémopexine (Hpx), une protéine plasmatique qui se retrouve à des concentrations de 4,0-5,0 g/L. Par la suite, le complexe Hpx-hème s'attache au récepteur CD91 qui permet son internalisation par les hépatocytes (Ascenzi *et al.*, Fasano, 2007). Dans les états d'anémie hémolytique, les niveaux d'Hpx disponibles sont faibles à cause de la saturation des molécules disponibles. A ce stade, l'albumine peut lier l'hème libre et peut contrer temporairement ses effets pro-oxydants (Figure 1.1). Le glutathion réduit (GSH), extracellulaire, joue également un rôle important dans le mécanisme de détoxification de l'hème. Le GSH offre une protection contre le SOx induit par l'hème en dégradant l'hème directement et en piégeant les ROS générés. Le GSH est capable de dégrader l'hème en solution à un pH optimum de 7. La dégradation de l'hème dépend de la présence d'oxygène et des concentrations de GSH. (Ballatori *et al.*, 2009). En présence de concentrations importantes d'hème libre, la production de ROS est aussi importante et cause des dommages oxydatifs (Ferreira *et al.*, 2008).

Les mécanismes décrits ci-dessus interviennent en réponse aux épisodes hémolytiques caractéristiques des maladies comme la thalassémie, l'anémie falciforme et la

malaria. Ces mécanismes jouent un rôle important dans le contrôle du SOx induit par l'Hb et l'hème libre. Il est évident que ces stratégies s'avèrent insuffisantes pour éliminer l'hème libéré, étant donné que dans ces conditions, les concentrations d'hème libre, non lié à des protéines plasmatiques, excèdent 20  $\mu\text{M}$  (Arruda *et al.*, 2004). L'hème est un agent oxydant fort, impliqué dans l'induction du SOx chez les patients avec des anémies hémolytiques (Phumalaa, *et al* 2003). Les concentrations d'hème supérieures à 1  $\mu\text{M}$  peuvent être toxiques pour la plupart des cellules, car l'hème catalyse la production de ROS formant des radicaux libres qui sont générés dans la réaction de Fenton ( $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}$ ) (Jomova *et Valko*, 2011).

### **1. 1. 3. L'ostéoporose associée à l'anémie**

L'ostéoporose est une maladie associée à une diminution de la masse osseuse, ce qui entraîne une fragilité des os et des fractures (Anapliotou *et al.*, 1995). Chez les patients avec de l'anémie hémolytique, le développement de l'ostéoporose résulterait de la perte prématurée des cellules sanguines (Baldanzi *et al.*, 2011; Galanello *et Origa*, 2010; Sarrai *et al.*, 2007; Voskaridou *et al.*, 2009). Cette ostéoporose a été liée à des facteurs tels que l'érythropoïèse accrue (Mahachoklertwattana *et al.*, 2006), et les effets néfastes du SOx sur les ostéoblastes (Barbagallo *et al.*, 2010) et sur l'ostéoclastogenèse (Lin *et al.*, 2010; Zwerina *et al.*, 2005). Tous ces facteurs renforcent la relation étroite qui existe entre les deux maladies.

#### **1. 1. 3. 1. Métabolisme osseux**

Le système squelettique est constitué des os et du cartilage. Il occupe deux fonctions majeures. La première fonction, plutôt mécanique, en est une de protection et de support des organes vitaux de même que de points d'attache des muscles du corps. La deuxième fonction en est une métabolique puisque l'os sert de réserve d'ions calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) et phosphate ( $\text{PO}_4^-$ ) nécessaires au maintien de l'homéostasie de l'organisme (Hadjidakis *et Androulakis*, 2006). L'os est une structure complexe et dynamique. À l'image des autres tissus conjonctifs, des cellules spécialisées, désignées ostéoclastes et ostéoblastes, sont dispersées à l'intérieur d'une matrice riche en constituants intercellulaires.



### 1. 1. 3. 1. 1. Tissu osseux

La matrice osseuse, appelée ostéoïde, comprend environ 25% d'eau, 25% de fibres protéiques comme le collagène et 50% de cristaux minéraux, principalement d'hydroxyapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) (Hadjidakis *et* Androulakis, 2006). Deux types d'os peuvent être distingués : l'os cortical (ou compact) et l'os trabéculaire (ou spongieux) (Hadjidakis *et* Androulakis, 2006).

L'os cortical, qui représente environ 80% du squelette, est majoritairement retrouvé dans les os longs (Holz *et al.*, 2007). Il est plus dense et compact, présente un faible taux de remodelage et est résistant aux torsions (Hadjidakis *et* Androulakis 2006). Pour sa part, l'os trabéculaire est majoritairement situé aux extrémités des os longs et dans les vertèbres. Il présente un taux de remodelage élevé, est moins dense et plus élastique (Holz, *et al.*, 2007).

### 1. 1. 3. 1. 2. Les ostéoclastes

Les ostéoclastes sont les cellules responsables de la dégradation ou résorption de la matrice osseuse. Ces cellules sont multinucléées et de grande taille, et occupent une cavité appelée lacune de résorption, attachées fermement à la matrice osseuse. Les ostéoclastes sont formés par la fusion de plusieurs cellules mononucléées dérivées de la lignée monocyttaire (Wilson *et al.*, 2009). Les ostéoclastes se caractérisent par leur membrane plissée, en forme de brosse, par laquelle ils adhèrent à la surface de l'os au moyen d'intégrines. Le processus de résorption osseuse requière la libération de protéases dans le microenvironnement délimité par la membrane plissée. Ce microenvironnement est maintenu à un pH acide par le transport de protons généré par une pompe à protons, un échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  et l'anhydrase carbonique (Boyce *et al.*, 2009). Ce faible pH permet la dissolution des cristaux d'hydroxyapatite et assure une activité optimale des enzymes protéolytiques.

Les enzymes lysosomiales des ostéoclastes, impliquées dans le processus de dégradation de la matrice osseuse, sont des cystéine-protéases comme la cathepsine et la phosphatase acide tartrate-résistante (cette dernière est utilisée comme marqueur du

phénotype ostéoclastique). La formation des ostéoclastes est régulée par les hormones parathyroïdienne (PTH) et calcitonine, ainsi que par l'IL-6.

### 1. 1. 3. 1. 3. Les ostéoblastes

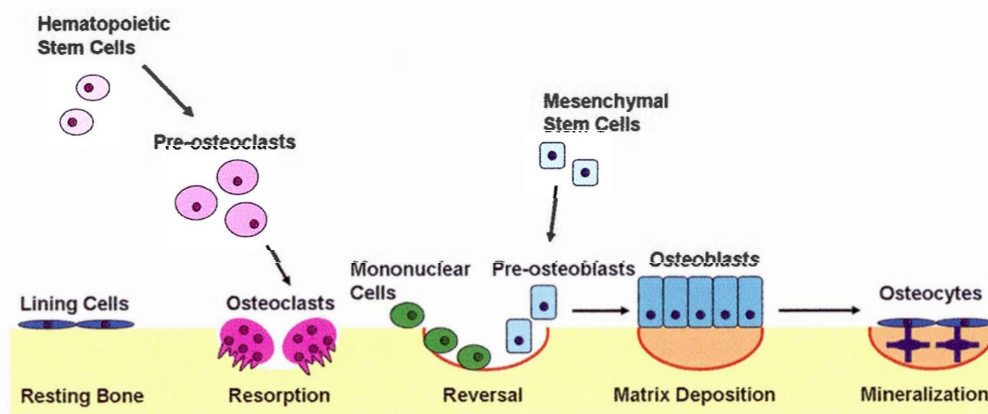
Les ostéoblastes sont les cellules responsables de la formation de l'os. Les ostéoblastes proviennent des cellules ostéoprogénitrices de la moelle osseuse, les cellules mononucléées dérivées de cellules mésenchymateuses (Boyce *et* Xing, 2008). Ces cellules ostéoprogénitrices expriment le facteur de transcription Cbfa1/Runx2. Lorsque les cellules ostéoprogénitrices entreprennent leur différenciation, elles expriment différents composants du tissu osseux incluant le collagène de type I, l'ALP, l'ostéocalcine, l'ostéonectine, etc. Ainsi, les ostéoblastes sont des cellules osseuses spécialisées à produire la matrice particulière qui constitue l'os. Les ostéoblastes conservent leur capacité à se répliquer et à produire la matrice osseuse jusqu'au moment où ils se retrouvent entourés par cette matrice et passent à un état de quiescence, alors appelés ostéocytes, où ils assurent un rôle de maintien du tissu osseux (Kobayashi *et* Kronenberg, 2005).

### 1. 1. 3. 1. 4. Le remodelage osseux

L'activation des ostéoclastes est régulée par plusieurs signaux moléculaires, dont le RANKL (le ligand du récepteur activateur du facteur nucléaire  $\kappa$ B). Cette molécule stimule le RANK, une protéine de surface des pré-ostéoclastes. Le RANKL est une molécule importante du métabolisme osseux, qui s'exprime à la surface des ostéoblastes. Sa principale fonction est l'activation des ostéoclastes (Kearns *et al.*, 2008). La surproduction de RANKL est impliquée dans une grande variété de maladies dégénératives du tissu osseux, comme l'arthrite rhumatoïde ou l'arthrite psoriasique (Findlay *et al.*, 2008). Dans ces cas, l'activation des lymphocytes T induit l'expression du gène de RANKL chez les ostéoblastes et entraîne un accroissement de l'ostéoclastogénèse et la résorption du tissu osseux (Graham *et al.*, 2009)(Figure 1.3).

Le RANK est une protéine homotrimérique transmembranaire qui fait partie de la superfamille des récepteurs du TNF. Cette protéine est exprimée dans plusieurs tissus, et plus particulièrement par les précurseurs des ostéoclastes. Lorsque le RANKL active RANK, il y a

activation de la kinase anti-apoptotiques AKT/PKB à travers un système complexe de signaux qui implique les kinases Src et TRAF6, ce qui indique que cette protéine peut être aussi impliquée dans la régulation de l'apoptose (Mizukami *et al.*, 2002).



**Figure 1.3 : Le remodelage osseux.** Le remodelage osseux débute lorsque les cellules souches myéloïdes se différencient en ostéoclastes et résorbent la matrice osseuse. Par la suite, les cellules mononucléaires terminent la préparation de la surface osseuse et les ostéoblastes débutent la synthèse d'une nouvelle matrice. Celle-ci devient par la suite minéralisée, et les cellules deviennent des ostéocytes, ce qui complète le cycle de remodelage (Kapinas *et Delany*, 2011 ).

L'ostéoprotégérine (OPG) est connue comme un facteur d'inhibition de l'ostéoclastogénèse. Cette molécule est aussi un membre de la superfamille du facteur récepteur tumoral de nécrose 11B (Simonet *et al.*, 1997). L'OPG est sécrétée par les ostéoblastes et agit comme récepteur pour le RANKL (Schoppet *et al.*, 2004) ce qui l'empêche de se lier à RANK sur les pré-ostéoclastes. Ce récepteur peut réduire la production des ostéoclastes par l'inhibition de la différenciation des précurseurs.

Le facteur de stimulation de colonies de macrophages (M-CSF) est une cytokine sécrétée entre autre par les ostéoblastes, qui active les cellules hématopoïétiques de la lignée monocytes-macrophages (Hodge *et al.*, 2011). A partir de cellules souches totipotentes hématopoïétiques, le facteur de transcription PU.1, avec le M-CSF, entraînent l'engagement

de cellules souches communes vers la lignée des macrophages et des ostéoclastes. Le M-CSF stimule la prolifération des précurseurs ostéoclastiques et augmente l'expression de RANK, tandis que le PU.1 régule positivement la transcription de c-FMS, le récepteur du M-CSF. Avec l'expression de c-FMS et des récepteurs RANK, les précurseurs sont pleinement engagés vers la différenciation ostéoclastique (Glantschnig *et al.*, 2003; Hodge, 2011).

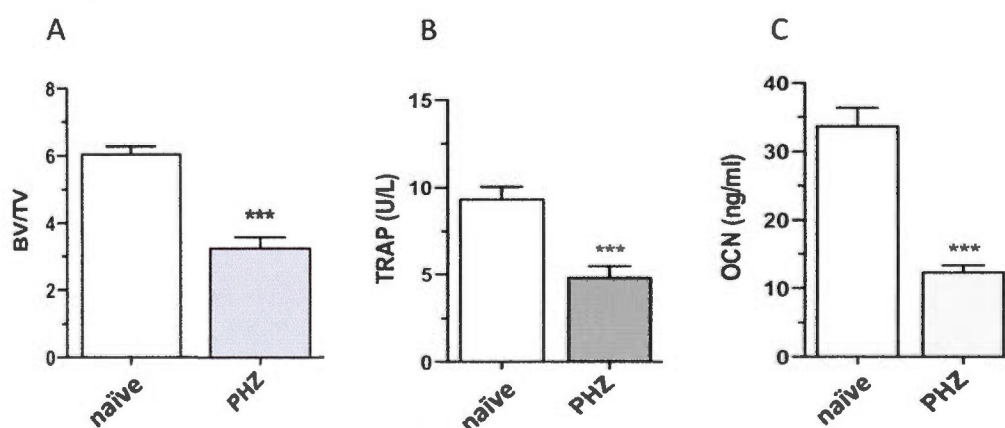
### 1. 1. 3. 2. Stress oxydatif et le métabolisme osseux

Le SOx représente un déséquilibre entre la production et l'élimination de ROS et la capacité d'un système biologique à détoxifier les intermédiaires réactifs ou à réparer les dommages causés. La perturbation de l'état normal d'oxydoréduction des cellules peut provoquer des effets toxiques à travers la production de peroxydes et de radicaux libres qui endommagent les composants cellulaires, incluant les protéines, les lipides et l'acide désoxyribonucléique (ADN). Certaines formes de ROS peuvent même agir comme messagers par un phénomène appelé signalisation redox (Touyz, 2004). Dans le remodelage osseux, le SOx a été identifié comme étant la cause de l'inactivation possible de l'expression de RANK-L et RANK (Forman *et* Torres, 2002). D'autre part, le SOx a également été impliqué comme élément régulateur de la fusion des ostéoclastes dépendant de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase (Quinn *et* Schepetkin, 2009). Sanchez-Rodriguez et collaborateurs ont fait un inventaire de différents marqueurs du SOx chez les patients atteints d'ostéoporose, et ont constaté que les SOx sont des facteurs de risque pour l'ostéoporose (Sanchez-Rodriguez *et al.*, 2007).

Une étude préliminaire réalisée par T. Scorza et R. Moreau a révélé une chute importante des marqueurs sériques de résorption et formation osseuses chez des souris BALB/c soumises à une anémie hémolytique par injection de phénylhydrazine (PHZ) (Figure 1.4). La chute des marqueurs de formation étaient plus marquées que celle associée à l'activité des ostéoclastes, menant à un niveau de remodelage en faveur de la résorption. Comme ces altérations n'étaient pas observées suite à l'induction d'une anémie sans hémolyse par saignement, les chercheurs ont émis l'hypothèse que l'hème libre affecte les cellules remodelatrices de l'os, ainsi que la fonction hématopoïétique de la moelle osseuse.



Au niveau de l'os, une réduction du volume trabéculaire chez les souris exposées à l'hémolyse aiguë par rapport aux souris saignées, suggère que l'hémolyse exerce un stress distinct du saignement dans la moelle de l'os et peut contribuer à l'ostéoporose par un mécanisme indépendant de l'hyperplasie associée à une production accrue d'érythrocytes (Moreau *et al.*, 2012).



**Figure 1.4 : Effet de l'administration de phénylhydrazine sur la masse osseuse et les niveaux des marqueurs sériques du remodelage osseux chez des souris BALB/c.** A) La densité de la masse osseuse est exprimée en pourcentage du volume osseux (BV) sur le volume total (TV). Le sérum des souris traitées à la phénylhydrazine (PHZ) et des souris naïves a été utilisé pour le dosage par ELISA du marqueur de résorption osseuse, l'isoforme 5b de la phosphatase acide résistante au tartrate (TRAP5b) et du marqueur de formation osseuse, l'ostéocalcine (OCN). L'injection de PHZ entraîne une diminution de la masse osseuse, ainsi qu'une inhibition importante du remodelage osseux (test T de Student \*\*\* $P < 0.001$ ,  $n \geq 5$ ) (Moreau *et al.*, 2012).

### 1. 1. 3. 3. La régulation du remodelage osseux par la HO-1

L'activité de l'HO-1 a été étudiée dans différents organismes et processus métaboliques tel que décrit ci-dessus. On attribue à cette enzyme un rôle dans le métabolisme osseux comme inhibitrice de l'ostéoclastogénèse (Zwerina *et al.*, 2005). Ces auteurs ont trouvé que l'induction de l'HO-1 dans les cellules spléniques contribue à une diminution de la formation des ostéoclastes, à une augmentation de l'expression d'HO-1 dans les cellules mononucléées et à une absence dans les cellules multinucléées (Zwerina *et al.*, 2005). L'activité de l'HO-1 a

également été évaluée dans les ostéoblastes et des études montrent qu'une augmentation de l'expression d'HO-1 entraîne une diminution des niveaux d'ARNm des marqueurs ostéoblastiques tels l'ALP, l'OCN et du facteur de transcription « Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) » dans des cultures cellulaires de la moelle osseuse (Lin *et al.*, 2010). Toutefois, Barbagallo et collaborateurs ont constaté que l'augmentation de l'expression d'HO-1 est associée à une augmentation de la formation d'ostéoblastes à partir de cellules souches mésenchymateuses (Barbagallo *et al.*, 2010). Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent une relation étroite entre le métabolisme osseux et l'HO-1.

## 1. 2. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

La réduction de la masse osseuse et la chute des niveaux sériques de marqueurs de métabolisme osseuse en condition d'anémie hémolytique mesurées lors de nos études préliminaires nous incitent à proposer une corrélation entre la protoporphyrine hème et les perturbations du mécanisme de remodelage osseux. Notre hypothèse est que l'hème libéré lors de conditions hémolytiques inhibe le remodelage osseux et cause une baisse dans l'activité des ostéoblastes et ostéoclastes. Dans le contexte de cette hypothèse nous avons étudié *in vivo* et *in vitro* l'effet de l'HE, en utilisant des lignées cellulaires ostéoblastiques et des cellules de la moelle osseuse de souris. Le présent projet de recherche a été réalisé selon les objectifs suivants:

1. Étudier les effets de l'injection d'HE sur la différenciation des ostéoclastes à partir de précurseurs de la moelle osseuse de souris BALB/c *in vivo*.
2. Étudier les effets de l'ajout *in vitro* d'HE sur la différenciation des ostéoclastes à partir de précurseurs de la moelle osseuse de souris BALB/c.
3. En utilisant des lignes d'ostéoblastes (MG63 et MC3T3), évaluer *in vitro* l'impact de l'HE sur leur viabilité, l'expression de l'HO-1 comme un mécanisme de protection et les niveaux de ROS.

## CHAPITRE II

### DÉMARCHE MÉTHODOLOGIQUE

#### 2. 1. MATÉRIEL & MÉTHODES

##### 2. 1. 1. Volets *in vivo* et *ex-vivo*

##### 2. 1. 1. 1. Cultures cellulaires à partir des cellules de la moelle osseuse de souris BALB/c injectées ou non avec l' hémine (HE)

Le protocole expérimental utilisé a été approuvé par le Comité institutionnel de protection des animaux (CIPA) (protocole 0611-725-1011) et a été réalisé en conformité avec les lignes directrices du Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA), du gouvernement de Canada.

Afin d'étudier les effets de l'HE sur la différenciation des ostéoclastes à partir de précurseurs de la moelle osseuse, des souris BALB/c (provenant de Charles River) de 6 à 8 semaines d'âge ont été injectées avec de l'HE (Sigma) par la voie intra-péritonéale à une concentration de 10 mg/kg de poids corporel. Cette concentration a été utilisée car elle se retrouve la gamme de concentrations d'hème intracellulaires présentes dans des conditions pathologiques. L'HE a été administrée trois fois par semaine, chaque deux jours, pendant deux semaines. Des souris contrôles ont été injectées avec un volume comparable de tampon phosphate salin (PBS : 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO-2H<sub>2</sub>O et 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) servant de véhicule pour l'HE.

Les souris ont été sacrifiées après deux semaines de traitement et les cellules de la moelle osseuse ont été prélevées par dissection des tibias et femurs, et centrifugation. Les cellules ont étéensemencées dans des pétris de 100 mm (Sarstedt) et incubées dans du milieu « Minimum essential medium alpha» (αMEM, Invitrogen) supplémenté avec 10% de sérum

bovin fœtal (FBS, PAA) et antibiotiques (pénicilline 100 unités/ml et streptomycine 100 µg/ml) (Hyclone). Après 24 heures, les cellules non adhérentes ont été retirées des contenants de culture et les cellules adhérentes ont été conservées en culture dans du milieu complet  $\alpha$ MEM durant 15 jours, avec des changements périodiques de milieu chaque 5 jours. Par la suite, les cellules ont été fixées au méthanol et colorées au Giemsa, et le nombre de colonies cellulaires a été déterminé par dénombrement au microscope optique.

Les cellules non adhérentes récupérées ont été resuspendues dans le milieu  $\alpha$ MEM supplémenté avec 10% de FBS à une concentration de  $1 \times 10^6$  cellules/ml, et 200 µl de cette suspension ont étéensemencés dans des puits d'une plaque de 96 puits (Costar). Pour stimuler la formation d'ostéoclastes à partir des précurseurs, les cellules non-adhérentes de la moelle osseuse ont été traitées avec du M-CSF (50ng/ml) et du RANK-L (100 ng/ml) (eBioscience). Les cellules ont été gardées en culture pendant 7 jours avec un changement du milieu de culture supplémenté avec le M-CSF et le RANKL après 3 jours. Au septième jour, le milieu de culture a été retiré et les cellules ont été rincées avec du PBS. Par la suite, les cellules ont été fixées et l'activité TRAP a été détectée en utilisant la trousse de Sigma selon les recommandations du fournisseur. Les cellules avec plus de trois noyaux colorées pour l'activité TRAP (TRAP5+), correspondant aux ostéoclastes différenciés ont été ensuite comptées.

## **2. 1. 1. 2. Marquage des précurseurs des ostéoclastes**

Nous avons caractérisé les cellules provenant de la moelle osseuse qui agissent comme précurseurs des ostéoclastes. Une fraction des cellules provenant de la moelle osseuse des souris contrôle et traitées avec l'HE a été marquée avec des anticorps anti CD11b-FITC en combinaison soit avec un anticorps anti-RANK-PE ou anti-M-CSFr-PE (Invitrogen, Burlington, Canada). Les niveaux d'expression de RANK et du récepteur pour le M-CSF (correspondant à la fluorescence moyenne, Gmean) parmi les cellules positives pour CD11b (CD11b+, précurseurs d'ostéoclastes) ont été estimés par cytométrie de flux (FACScan Becton Dickinson, Oakville, Canada). Les données ont été analysées à l'aide du logiciel WinMDI version 2.6.



### **2. 1. 2. Volet *ex-vivo*.**

#### **2. 1. 2. 1. Formation d'ostéoclastes à partir des cellules de la moelle osseuse de souris BALB/c exposées à l' hémine (HE)**

Afin de confirmer l'étude avec les cellules de la moelle provenant de souris injectées avec l'HE, nous avons évalué l'effet de l'ajout d'HE sur la différenciation *in vitro* des ostéoclastes à partir de précurseurs de la moelle osseuse de souris BALB/c naïves. Des souris femelles de 6 à 8 semaines d'âge ont été sacrifiées et les cellules de la moelle osseuse ont été prélevées par dissection. Les cellules ont étéensemencées dans des pètres de 100 mm et incubées dans du milieu  $\alpha$ MEM supplémenté avec 10% de FBS et antibiotiques (pénicilline 10 unités/ml et streptomycine 10  $\mu$ g/ml). Après 24 heures, les cellules non adhérentes ont été récupérées et amenées à une concentration de  $1 \times 10^6$  cellules/ml, et 200  $\mu$ l de cette suspension ont étéensemencés dans des puits d'une plaque de 96 puits. Les cellules non-adhérentes de la moelle osseuse ont été stimulées avec du M-CSF (50 ng/ml) et du RANK-L (100 ng/ml) en absence ou présence d'HE (25  $\mu$ g/ml). Les cellules ont été gardées en culture pendant 7 jours avec un changement du milieu de culture supplémenté avec du M-CSF et du RANKL, après 3 jours. Au septième jour, le milieu de culture a été enlevé et suite à un lavage avec du PBS, les cellules ont été fixées et l'activité TRAP a été détectée en utilisant la trousse de Sigma. Les cellules avec plus de trois noyaux colorées (TRAP5+), correspondant aux ostéoclastes différenciés ont ensuite été comptées.

#### **2. 1. 2. 2. Effet d'un traitement *in vitro* avec l' hémine (HE) sur les fonctions de lignées d'ostéoblastes**

Afin de déterminer l'effet de l'HE sur les fonctions ostéoblastiques, nous avons utilisé les lignées ostéoblastiques MG-63 et MC3T3 provenant de l'« American Type Culture Collection » (ATCC) qui représentent respectivement des modèles de pré-ostéoblastes humains et d'ostéoprogéniteurs murins. Les cellules ont été conservées en culture avec du milieu de culture « Dulbecco's Modified Eagle Medium/HamF12 (DMEM/F12, Sigma) pour les cellules MG-63 et « Minimal Essential Medium » (MEM, Sigma) pour les cellules MC3T3. Le milieu de culture a été supplémenté avec 10% de FBS et antibiotiques

(pénicilline 10 unités/ml et streptomycine 10 µg/ml). L'effet de l'HE sur les différentes fonctions cellulaires a été évalué selon les expériences décrites dans les sections suivantes.

#### **2. 1. 2. 2. 1. Détermination de la viabilité des lignées ostéoblastiques traitées avec de l'hémine (HE)**

Pour les mesures de viabilité, les cellules ont étéensemencées dans des plaques de 96 puits et maintenues en culture pendant cinq jours. Par la suite, les cellules ont été exposées pendant 48 heures à des concentrations croissantes d'HE (0 à 60 µM) dans un milieu de culture sans FBS. La viabilité a été déterminée à l'aide du bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tétrazolium (MTT). L'anneau de tétrazolium qu'il contient est réduit en formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules métaboliquement actives, qui précipite et donne une couleur violette. La quantité de précipité formée est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes. Les cristaux de formazan sont solubilisés dans du diméthylsulfoxyde (DMSO). La mesure de la densité optique à 570 nm à l'aide d'un spectrophotomètre a permis de déterminer la quantité relative de cellules vivantes et actives métaboliquement. Les résultats ont été exprimés selon un ratio de la viabilité cellulaire comparée aux cellules contrôle sans HE.

#### **2. 1. 2. 2. 2. Mesure de l'activité phosphatase alcaline**

L'ALP est une enzyme hydrolytique qui enlève les groupements phosphates, et dont l'activité est optimale en condition alcaline. Cette enzyme représente un marqueur de l'activité ostéoblastique. Pour évaluer *in vitro* l'impact de l'HE sur l'activité ALP des ostéoblastes, les cellules MG-63 et MC3T3 ont étéensemencées dans des plaques de 24 puits (Sarstedt) et maintenues en culture pendant cinq jours. Par la suite, les cellules ont été exposées durant 48 heures à des concentrations croissantes d'HE (0 à 60 µM) dans le milieu de culture sans FBS. Par la suite, les cellules ont été solubilisées dans le tampon de réaction (100 mM glycine, 1 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1% Triton X-100, dont le pH est ajusté à 10,5) et l'activité ALP a été évaluée en présence de PNPP (para-Nitrophényl Phosphate). L'ALP catalyse l'hydrolyse du PNPP en libérant le PNP (para-nitrophényl) et du phosphate, selon la réaction suivante:



Le taux de formation du PNP, mesurée par spectrophotométrie à 410 nm, est proportionnel à la concentration catalytique de l'ALP présente dans l'échantillon.

### **2. 1. 2. 2. 3. Dosage de protéines**

Afin de normaliser les résultats de l'activité ALP, la concentration des protéines cellulaires ont été quantifiées. La quantification des protéines a été effectuée par la méthode de dosage des protéines par l'acide bicinchoninique (BCA) qui combine la réduction du  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^{1+}$  par des protéines, dans un milieu alcalin, avec la détection colorimétrique hautement sensible et sélective du cation cuivreux ( $\text{Cu}^{1+}$ ) par le BCA. La première étape est la chélation du cuivre par les protéines dans un milieu alcalin pour former un complexe bleu clair. Dans cette réaction, connue comme la réaction de Biuret, des peptides contenant au moins trois résidus d'acides aminés sous forme d'un complexe chélate des ions cuivriques dans un environnement alcalin contenant du tartrate de potassium sodium. Dans la deuxième étape de la réaction de développement de la couleur, le BCA réagit avec le cation cuivreux qui a été formé à la première étape. L'intense couleur pourpre est produite par la réaction de chélation de deux molécules de BCA avec un ion cuivreux. Le complexe BCA/cuivre est soluble dans l'eau et présente une forte absorbance linéaire à 562 nm avec les concentrations de protéines. Le réactif BCA est environ 100 fois plus sensible (limite inférieure de détection) que la couleur bleu pâle de la première réaction (Walker, 1994). La réaction qui conduit à la formation de la couleur BCA est fortement influencée par quatre résidus d'acides aminés (cystéine ou de cystine, la tyrosine et le tryptophane) dans la séquence d'acides aminés de la protéine. La courbe standard a été préparée à partir d'une solution mère de BSA (albumine de sérum bovin) (Sigma) à 2 mg/ml. La coloration des échantillons de la courbe standard a été évaluée à 570 nm.

### **2. 1. 2. 2. 4. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) et immunobuvardage de l'hème oxygénase 1 (HO-1)**

Nous avons déterminé les niveaux d'expression d'HO-1 suite à une exposition des cellules à l'HE. Les ostéoblastes ont étéensemencés dans des plaques de 12 puits (Sarstedt)



et maintenus en culture cinq jours. Après une incubation avec l'HE (0 à 60  $\mu$ M) pendant 48h, les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS et lysées pendant 30 minutes à 4°C avec 75  $\mu$ L du tampon de lyse (1 M Tris pH 6,8, 5 M NaCl, 20% Glycerol, 2% IGEPAL Co-630, 300 mM PMSF, 10 mg/ml Aprotinine, 5 mg/ml Leupeptine, 100 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 500 mM NaF). Les cellules ont ensuite été centrifugées à 13000 rotation par minute (rpm) pendant 15 minutes à 4°C, et le surnageant a été récupéré et conservé à -80°C. Une quantification des protéines a été effectuée par la méthode BCA tel que décrit ci-dessus.

Les protéines cellulaires ont été resuspendues dans le tampon Laemmli (63 mM Tris HCl, 10% Glycérol, 2% de sodium dodécylsulfate (SDS), 0,0025% de bleu de bromophénol, pH 6,8) contenant 5% de  $\beta$ -mercaptoéthanol et séparées dans un gel de polyacrylamide à 12% avec un tampon de migration (0,25 M Tris base, 1,92 M Glycine, 1% SDS). La migration des protéines a eu lieu à 100 volt (V) pendant 15 minutes et ensuite à 140V pendant 1 heure 30 minutes (Criterion Blotter – Biorad).

Les protéines résolues sur SDS-PAGE ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose (BIORAD Trans-Blot<sup>®</sup> Pure Nitrocellulose membrane 0.45  $\mu$ m) en présence du tampon de transfert (0.025 M Tris base, 0.192 M glycine, 10% méthanol), en utilisant un appareil de transfert (BIORAD CRITERION BLOTTER<sup>®</sup>). Les protéines ont été transférées à 100V pendant 90 min avec agitation à 4°C. Le transfert de protéines a été vérifié par une coloration au rouge de Ponceau (0.1% ponceau S, 1% acide acétique) (Sigma). La membrane a été ensuite bloquée avec la solution SuperBlock<sup>®</sup> (Thermo scientific) contenant 0.05% Tween pendant 3 heures à température ambiante. Après le blocage, la membrane a été incubée pendant 3 heures à température ambiante avec un anticorps primaire polyclonale anti HO-1 de lapin (SPA-894, Stressgen) dilué 1/1000 dans du PBS contenant 3% de lait écrémé. Suite aux trois lavages avec PBS contenant 0,05% Tween, la membrane a été incubée avec un anticorps secondaire anti-lapin couplé à la peroxydase (A 9169, Sigma) à une dilution de 1/10000 dans du PBS contenant 0,05% Tween. Une incubation d'une heure a ensuite été réalisée à température ambiante suivie de 3 lavages avec PBS contenant 0,05% Tween. Pour la détection par chemiluminescence, le Kit Super Signal<sup>®</sup> West Pico Chemiluminescent (Thermo Scientific) a été utilisé et les signaux ont été visualisés par chimioluminescence amplifiée en utilisant un film Kodak X-OMAT LS.

#### **2. 1. 2. 2. 5. Production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les lignées ostéoblastiques exposées à l'hémine (HE)**

Afin de déterminer la production de ROS en présence d'HE, les cellules MG-63 et MC3T3 ont été exposées à l'HE (25  $\mu$ M) dans du milieu de culture sans sérum pour 1 heure. Un marquage avec la sonde 2',7' -dichlorofluorescein diacetate (D-CFDA) (10  $\mu$ M) (Sigma) a été réalisé afin de mesurer la fluorescence moyenne correspondant aux niveaux de ROS à l'aide d'un cytofluoromètre (FACScan Becton Dickinson, Oakville, Canada). Les données ont été analysées à l'aide du logiciel WinMDI version 2.6.

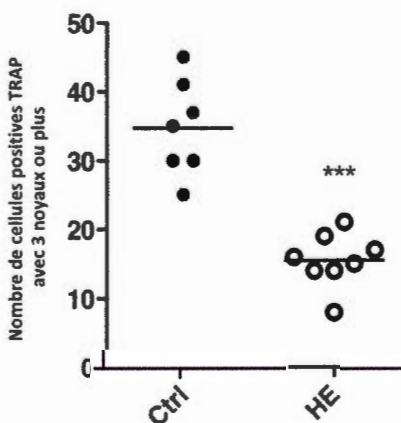
#### **2. 1. 3. Analyses statistiques**

Afin de comparer les résultats, le logiciel GraphadPad Prism® version 5 a été utilisé. Les résultats ont été analysés par un test de T de Student lorsque qu'il y a eu seulement deux groupes de données à comparer. Le test de Dunnett à comparaisons multiples a été utilisé afin de comparer trois groupes et plus à un groupe contrôle. Le seuil de significativité a été fixé à  $p < 0,05$ .

## 2.2. RÉSULTATS

### 2. 2. 1. Ostéoclastogenèse à partir de précurseurs cellulaires exposés *in vivo* à l'hémine (HE)

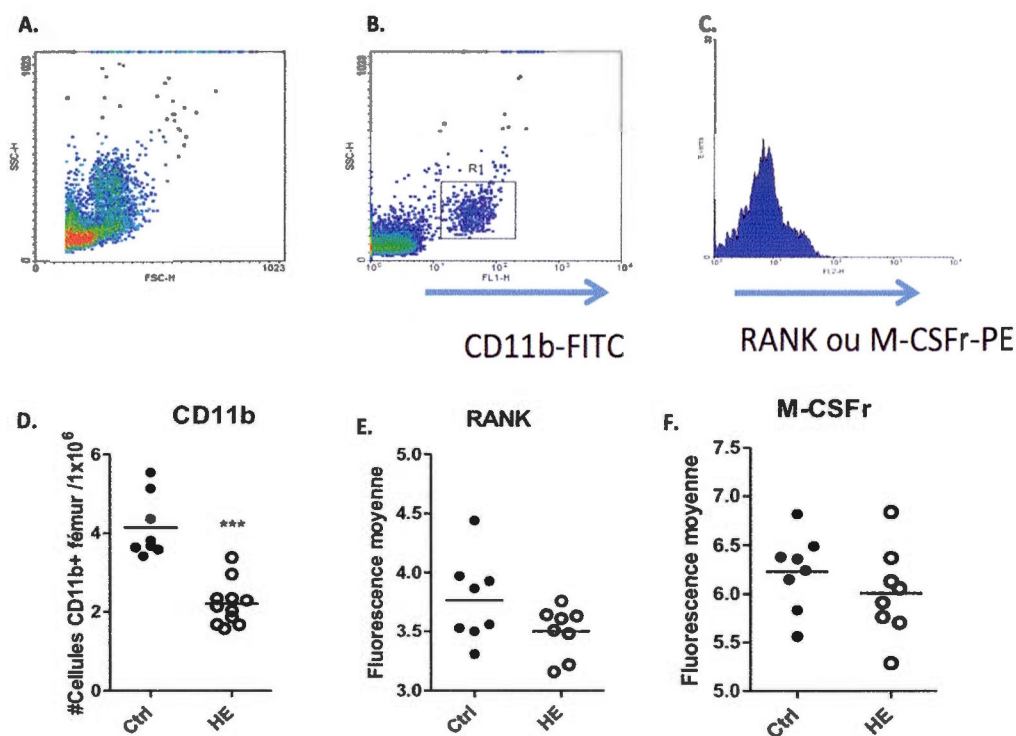
Les résultats que nous avons publiés récemment (Moreau *et al.*, 2012) indiquent que l'induction d'une anémie hémolytique aiguë par un traitement avec la PHZ ou par une infection avec *Plasmodium chabaudi* entraîne une diminution du volume de l'os trabéculaire des tibias des souris. Afin de déterminer le rôle de l'hème libéré lors de l'hémolyse dans la dérégulation du métabolisme osseux, des souris ont été injectées avec l'HE (10 mg/kg de poids corporel) pendant trois semaines. Une diminution significative de la formation d'ostéoclastes a été mesurée en utilisant les cellules non-adhérentes de la moelle provenant de souris injectées avec l'HE, par rapport aux cellules provenant de souris n'ayant pas été injectées avec l'HE (Figure 2.1).



**Figure 2.1 : Différenciation des ostéoclastes à partir des cellules de la moelle osseuse des souris BALB/c contrôles (Ctrl) et injectées avec de l' hémine (HE).** Des souris BALB/c femelles ont reçu 10 mg/Kg de poids d'HE par la voie intra-péritonéale, 3 fois par semaine, durant 2 semaines. Les souris contrôles ont reçu des injections de PBS. Les cellules non adhérentes provenant de la moelle mise en culture ont été récupérées après une nuit de culture,ensemencées et stimulées avec 50 ng/ml de M-CSF et 100 ng/mL de RANKL. Sept jours après, le nombre des cellules avec plus de 3 noyaux et positives pour l'activité TRAP a été déterminé. Les données proviennent de 7 à 8 souris par groupe et expriment la moyenne ± SEM. Un test t de Student a été utilisé pour l'évaluation statistique des résultats. \*\*\*P<0,001.

### 2. 2. 2. L'analyse phénotypique des précurseurs des ostéoclastes dans la moelle osseuse

Puisque nous observons une diminution de l'ostéoclastogenèse des cellules provenant de la moelle de souris injectées avec l'HE, nous avons déterminé le nombre total de cellules précurseurs des ostéoclastes (cellules positives pour CD11b ; CD11b<sup>+</sup>) chez les souris traitées avec HE (Figures 2.2A et B). La protéine de surface CD11b est une intégrine exprimée par les précurseurs myéloïdes de la moelle osseuse, et ces précurseurs génèrent normalement des ostéoclastes en réponse à une stimulation par RANKL et M-CSF. Nous avons aussi déterminé le niveau d'expression des récepteurs RANK et du M-CSF (M-CSFr) par cytométrie de flux (Figure 2.2C). Une diminution significative du nombre de cellules CD11b<sup>+</sup> a été mesurée à partir des cellules de la moelle des souris injectées avec l'HE (Figure 2.2D). De plus, nos analyses ont montré une tendance à une diminution de RANK (non statistiquement significative) (Figure 2.2.E), alors que l'expression du M-CSFr n'a pas été affectée par le traitement (Figure 2.2F).

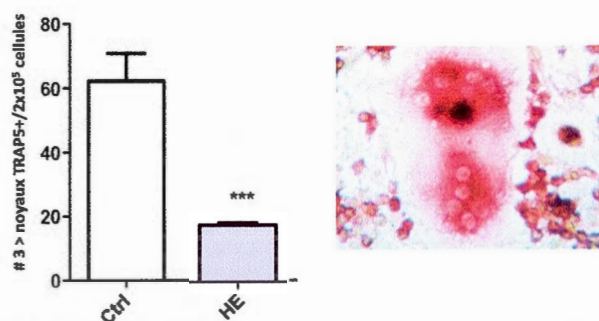


**Figure 2.2 : Analyse phénotypique des précurseurs d'ostéoclastes chez des souris BALB/c Ctrl et injectées avec de l'hémine (HE).** Les cellules de la moelle osseuse des souris BALB/c femelles contrôles (Ctrl) ou traitées avec de l'HE ont été isolées, et leur taille (FSC-H) et granularité (SSC-H) ont été analysées par cytofluorométrie de flux (A). Un marquage avec un anticorps anti-CD11b a permis de sélectionner (région R1) les cellules CD11b<sup>+</sup> (précurseurs d'ostéoclastes) (B). L'application simultanée de soit un anticorps anti-RANK-PE ou anti-M-CSFr-PE (C) a été réalisée pour estimer les niveaux d'expression de RANK et M-CSFr (fluorescence G moyenne) (C). Les cellules CD11b<sup>+</sup> (D) et l'expression de RANK (E) et M-CSFr (F) ont été quantifiées. Les résultats de deux expériences indépendantes avec l'HE *in vivo* regroupant 7 à 8 souris ont été compilés et comparés. Un test t de Student a été utilisé pour l'évaluation statistique des résultats. \*\*\*P<0,001. Les résultats représentent les moyennes  $\pm$  SEM des valeurs relatives de fluorescence comparées aux valeurs basales.



### 2. 2. 3. Ostéoclastogenèse à partir de précurseurs de la moelle exposés *in vitro* à l'hémine (HE)

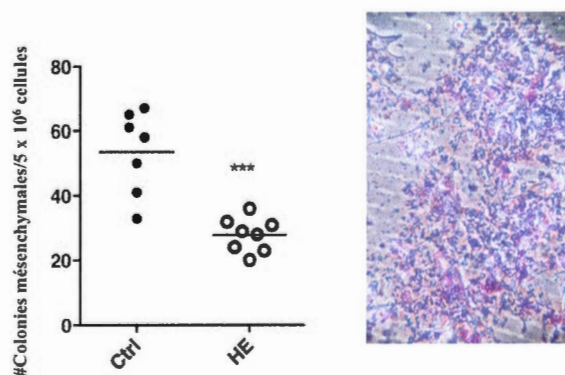
Nos résultats avec des cellules de la moelle de souris traitées avec de l'HE *in vivo* ont montré une diminution significative du nombre de précurseurs CD11b +, accompagnée d'une diminution du nombre d'ostéoclastes différenciés *ex vivo*. Afin d'évaluer si l'HE inhibe directement la capacité des précurseurs des ostéoclastes à se différencier *in vitro*, les cellules provenant d'animaux naïfs ont été récupérées et traitées avec de l'HE à 25  $\mu\text{g/mL}$  (équivalent à 38  $\mu\text{M}$ ). Cette concentration a été choisie en considérant que les niveaux d'HE libre augmentent au-delà de 20  $\mu\text{M}$  chez des souris souffrant d'anémie hémolytique (Seixas E *et al.*, 2005). Les cellules de la moelle osseuse ont été exposées à l'HE et immédiatement stimulées par ajout de M-CSF (50 ng/ml) et de RANK-L (100 ng/ml). Après sept jours, les cellules ont été fixées et l'activité TRAP a été révélée. Une diminution importante du nombre d'ostéoclastes a été mesurée chez les cellules traitées avec l'HE par rapport aux cellules non exposées (Figure 2.3). Ces résultats suggèrent que l'HE est capable d'inhiber la différenciation des ostéoclastes directement.



**Figure 2.3: Effet de l'hémine (HE) sur l'ostéoclastogenèse *in vitro*.** Les cellules de la moelle ont été récupérées et mises en culture. Après 24 heures, les cellules non adhérentes ont été récupérées et stimulées en présence d'HE à 25  $\mu\text{g/ml}$  durant les 3 premiers jours de différenciation. La stimulation a été réalisée avec 50 ng/ml M-CSF et 100 ng/ml RANK-L. Au jour 7, les cellules TRAP positives avec trois noyaux ou plus ont été comptées sous microscope de contraste. Les résultats représentent les moyennes  $\pm$  SEM de 8 expériences indépendantes. Un test t de Student a été utilisé pour l'évaluation statistique des résultats. \*\*\* $P < 0.001$ . A droite, une photo représentative des ostéoclastes TRAP positifs comptant plusieurs noyaux (grossissement 60X).

#### 2. 2. 4. Formation de colonies mésenchymales (précurseurs des ostéoblastes) à partir de la moelle de souris injectées avec l'hémine (HE)

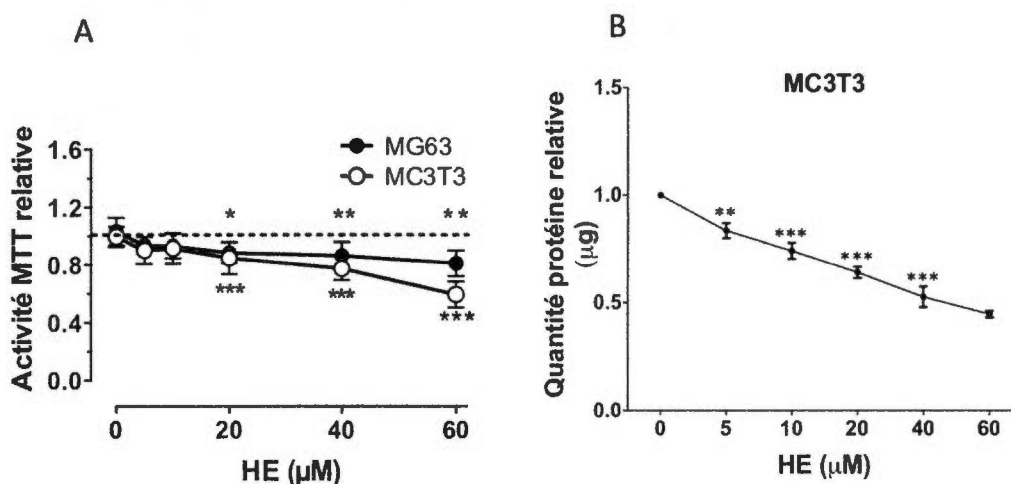
Afin de déterminer si l'HE influence les ostéoblastes, nous avons déterminé le potentiel de formation de colonies des cellules mésenchymateuses, représentant les précurseurs des ostéoblastes. Les cellules de la moelle de souris injectées avec l'HE (10 mg/kg de poids) pendant trois semaines et de souris contrôle ont été récupérées et mises en culture afin de récupérer les cellules adhérentes après 18 heures. Par la suite, les cellules adhérentes ont été conservées en culture pendant 15 jours, et les colonies de cellules mésenchymateuses ont été fixées à l'éthanol et colorées au Giemsa. De manière analogue à la formation des ostéoclastes, un nombre significativement plus faible de colonies mésenchymales a été obtenu à partir de la moelle osseuse des souris traitées avec l'HE *in vivo* (Figure 2.4).



**Figure 2.4 : Impact de l'hémine (HE) *in vivo* sur la formation *ex vivo* des colonies mésenchymales.** Des souris BALB/c femelles âgées de 4 à 6 semaines ont été injectées par la voie intra-péritonéale avec 10 mg/Kg d'HE 3 fois par semaine, durant deux semaines; des souris contrôles (Ctrl) ont reçu des injections de PBS. Un jour après la dernière dose d'HE, la moelle osseuse du fémur a été récupérée stérilement. Les cellules totales ont été mises en culture à raison de  $5 \times 10^6$  cellules/ml dans du milieu complet. Après 18 heures, les cellules non-adhérentes ont été retirées et les cellules adhérentes ont été périodiquement de milieu chaque 5 jours. Par la suite, les cellules ont été fixées au méthanol et colorées au Giemsa, puis les colonies ont été comptées sous microscope de contraste. Les résultats représentent les moyennes  $\pm$  SEM de 4 expériences indépendantes. Un test t de Student a été utilisé pour l'évaluation statistique des résultats. \*\*\* $P < 0,001$ . A droite, une photo représentative des colonies mésenchymales colorées au Giemsa (grossissement 60X).

### 2. 2. 5. Effet de l' hémine (HE) *in vitro* sur la viabilité de deux lignées ostéoblastiques

Afin de déterminer si le traitement avec l'HE affecte la viabilité des ostéoblastes *in vitro*, des tests MTT ont été effectués avec les cellules MG63 et MC3T3 exposées à l'HE (0 à 60  $\mu\text{M}$ ) pour 48 heures. Le traitement a entraîné une diminution dose-dépendante de l'activité MTT des deux lignées cellulaires (Figure 2.5A), avec des différences significatives à partir des concentrations de 20 $\mu\text{M}$ . Une diminution des niveaux de protéines cellulaires a été mise en évidence chez les cellules MC3T3 (Figure 2.5B).

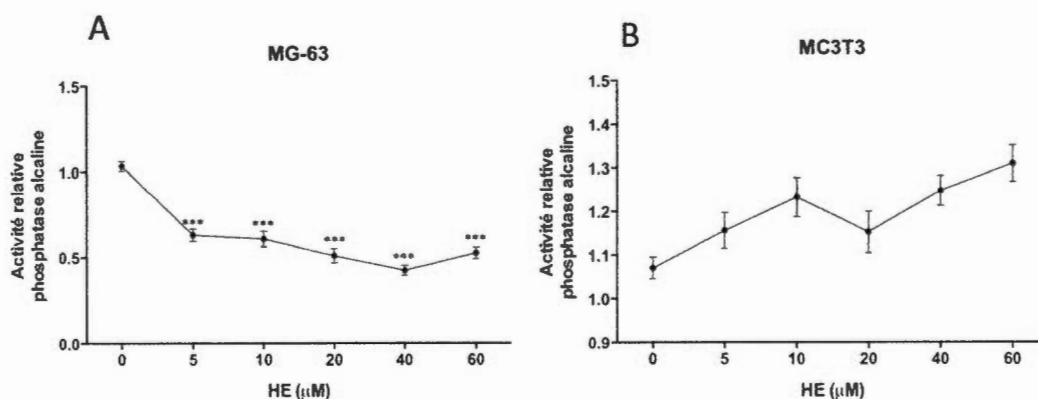


**Figure 2.5 : Effet de l'hémine (HE) sur la viabilité des cellules ostéoblastiques MG63 et MC3T3 (*in vitro*).** Les cellules MG-63 et MC3T3 ont été exposées à des concentrations croissantes d'HE dans du milieu de culture sans sérum. La viabilité a été déterminée 2 jours plus tard avec un test MTT (A) ou un dosage des protéines cellulaires (B). Les résultats représentent les moyennes  $\pm$  SEM des valeurs relatives au contrôle sans HE de 5 à 10 expériences indépendantes. Un test de variance ANOVA, suivi d'un post-test Dunnett, ont été utilisés pour comparer le contrôle avec les cellules traitées. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .



## 2. 2. 6. Effet de l'hémine (HE) sur l'activité phosphatase alcaline dans les lignées ostéoblastiques

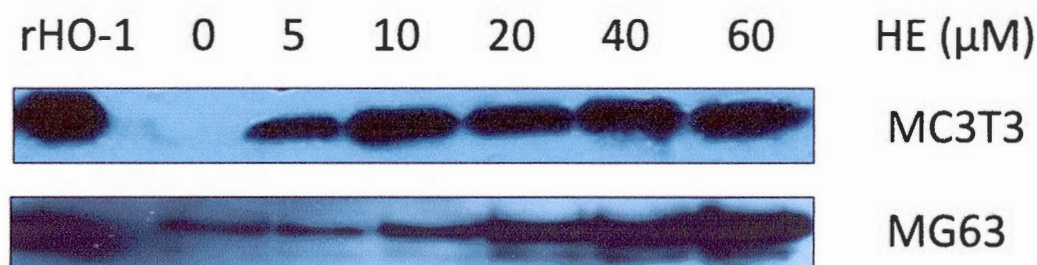
L'activité ALP représente le potentiel de formation osseuse des ostéoblastes. Afin d'évaluer l'effet de l'exposition de l'HE sur l'activité ALP des ostéoblastes, les deux lignées ostéoblastiques ont été traitées avec des concentrations croissantes d'HE (0 à 60  $\mu$ M) durant 2 jours. Les résultats montrent une diminution significative de l'activité ALP dans les cellules MG-63 (Figure 2.6A). Toutefois, l'activité ALP des cellules MC3T3 n'a pas été altérée par le traitement avec l'HE (Figure 2.6B).



**Figure 2.6 : Effet de l'hémine (HE) sur l'activité phosphatase alcaline des lignées ostéoblastiques MG63 et MC3T3.** Les cellules (A) MG-63 et (B) MC3T3 ont été exposées à des concentrations croissantes d'HE dans du milieu de culture sans sérum durant 2 jours. Par la suite, les cellules ont été solubilisées et l'activité ALP a été évaluée en présence de PNPP. Les résultats représentent les moyennes  $\pm$  SEM des valeurs relatives au contrôle sans HE de 5 à 10 expériences indépendantes. Les résultats ont été analysés par un test de variance ANOVA, suivi d'un post-test Dunnett; \*\*\*P<0,01.

### 2. 2. 7. Évaluation de l'expression de HO-1 après exposition à l' hémine (HE)

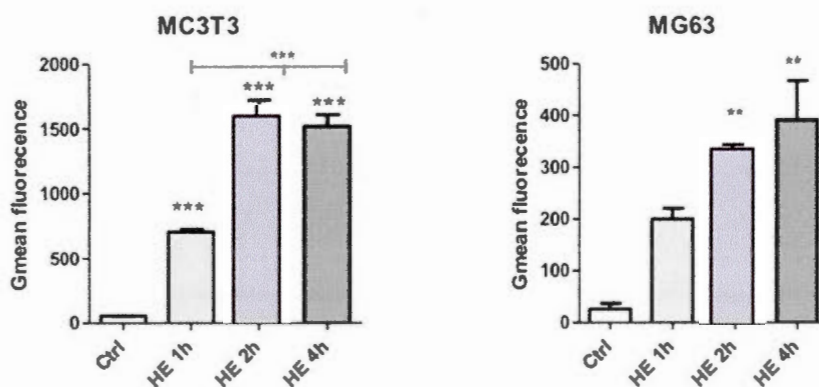
L'enzyme HO-1 joue un rôle important dans la protection cellulaire contre le SO<sub>x</sub> causé par l'HE et d'autres facteurs. Cette enzyme métabolise l'HE, et les métabolites générés activent plusieurs mécanismes de protection dans la cellule. On a procédé à l'évaluation de l'expression de HO-1 dans les deux lignées ostéoblastiques par immunodétection. Les cellules ont été exposées à différentes concentrations d'HE (0 à 60 µM) durant 48 heures. Par la suite, les cellules ont été lysées, et les protéines cellulaires ont été migrées sur un gel de polyacrylamide. Par la suite, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose pour la détection de HO-1. La figure 2.7 montre une augmentation dose-dépendante des niveaux de HO-1 dans les deux lignées cellulaires.



**Figure 2.7 : Expression de l'hème-oxygénase (HO)-1 chez les lignées ostéoblastiques MG63 et MC3T3 exposées à l' hémine (HE).** Les cellules MG-63 et MC3T3 ont été exposées à de concentrations croissantes d'HE dans du milieu de culture sans sérum pour 48 heures. Un total de 20 µg de protéines de chaque échantillon a été séparé dans un gel de SDS-PAGE (10%) et transférées sur une membrane de nitrocellulose pour la détection de la HO-1. La détection de l'HO-1 dans les lysats cellulaires a été comparée à celle de la protéine recombinant (rHO-1). La photo est représentative de 2 expériences indépendantes.

### 2. 2. 8. Production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) chez les lignées ostéoblastiques exposées à l' hémine (HE)

Dans des conditions d'hémolyse et en raison de la saturation des différents mécanismes de protection, l'HE libre s'accumule en circulation. Cette molécule est hautement pro-oxydante et peut déclencher la formation de ROS qui sont toxiques pour les cellules et activent différents mécanismes cytoprotecteurs et/ou la mort cellulaire. La production de ROS dans les lignées cellulaires MG-63 (Figure 2.8A) et MC3T3 (Figure 2.8B) exposées à l'HE (25  $\mu$ M) pendant 1 à 4 heures a été mesurée. Les cellules ont été marquées avec la sonde D-CFDA et les niveaux de ROS ont été déterminés à l'aide d'un cytofluoromètre. L'analyse indique une augmentation dose-dépendante et significative des niveaux de ROS intracellulaires dans les deux types cellulaires traités avec l'HE.



**Figure 2.8 : Niveaux d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) chez les lignées ostéoblastiques MG63 et MC3T3 exposées à l' hémine (HE).** Les cellules MG-63 et MC3T3 ont été exposées à l'HE (25 $\mu$ M) dans du milieu de culture sans sérum pour 1, 2 ou 4 heures. Un marquage avec la sonde D-CFDA (10  $\mu$ M) a été réalisé afin de mesurer la fluorescence moyenne (« Gmean fluorescence ») correspondant aux niveaux de ROS. Les résultats sont les moyennes  $\pm$  SEM de 4 expériences indépendantes. Un test de variance ANOVA, suivi d'un post-test Dunnett, a été utilisé afin de comparer le contrôle avec les cellules traitées. \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001

## CHAPITRE III

### DISCUSSION & CONCLUSION

#### 3. 1. DISCUSSION

Les patients qui souffrent de maladies hémolytiques chroniques, telles la beta-thalassémie et l'anémie falciforme, développent de l'ostéoporose (Korkmaz *et al.*, 2013 ; Laudisio *et al.*, 2009). Plusieurs chercheurs postulent que la production accrue de globules rouges pour contrer l'anémie amène à une hyperplasie de la moelle osseuse, qui entraîne un déséquilibre du remodelage osseux. Nous suggérons qu'en plus de cette hyperplasie, la rupture des globules rouges entraîne la libération d'hème, qui affecte rapidement les cellules osseuses.

Des travaux précédents du laboratoire de Moreau et Scorza ont indiqué un remodelage osseux altéré chez deux modèles murins d'anémie hémolytique (infection par *Plasmodium chabaudi adami* ou traitement avec la PHZ) (Moreau *et al.*, 2012). En effet, des baisses des niveaux des marqueurs sériques de formation osseuse (OCN) ont été mesurées chez ces deux modèles d'anémie hémolytique. Ces résultats suggèrent une inhibition de la formation osseuse. De plus, une chute significative des niveaux sériques du marqueur de résorption TRAP5b a été mesurée, ce qui suggère une diminution du nombre d'ostéoclastes. En concordance avec ce dernier résultat, une différenciation déficiente des précurseurs de la moelle osseuse en ostéoclastes a été constatée. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que l'anémie hémolytique affecte la viabilité et/ou la différenciation des ostéoblastes et ostéoclastes. Comme la concentration sérique du produit de la dégradation du collagène par les ostéoclastes, le télopeptide C-terminal du collagène (CTX), ne semblait pas affectée par l'anémie hémolytique (Moreau *et al.*, 2012), et comme le CTX est un marqueur de l'activité de résorption osseuse par les ostéoclastes, ces résultats suggèrent plutôt un déséquilibre du remodelage osseux en faveur de la résorption osseuse. Ce postulat est en accord avec la diminution de la masse osseuse trabéculaire mesurée chez des souris ayant une anémie

hémolytique (Moreau et al., 2012). Par contre, aucune altération importante des marqueurs sériques de remodelage osseux ni de la masse osseuse n'a été constatée chez des souris rendues anémiques par phlébotomie (saignement) (Moreau *et al.*, 2012).

Puisque nous postulons que la libération d'HE lors de l'anémie hémolytique joue un rôle important dans les altérations du métabolisme osseux, le but du présent projet de recherche était d'étudier l'impact de l'HE sur les cellules osseuses. Nous avons combiné des approches *ex vivo* à partir des cellules de la moelle de souris ayant reçues des injections intra-péritonéales d'HE et des traitements *in vitro* des cellules osseuses avec de l'HE. Nos résultats démontrent une diminution significative de la formation des ostéoclastes à partir des précurseurs provenant de la moelle osseuse de souris traitées avec l'HE (Figure 2.1). Ces résultats sont en accord avec les travaux précédents qui indiquaient une diminution de la différenciation des ostéoclastes à partir de cellules de la moelle osseuse de souris infectées par *Plasmodium c adami* ou traitées avec la PHZ. Ainsi, la libération d'HE suite à l'anémie induite par l'infection ou la PHZ serait en partie responsable de la diminution de l'ostéoclastogenèse.

La diminution du nombre d'ostéoclastes à partir des cellules de la moelle osseuse peut prendre son origine à plusieurs niveaux, allant d'une réduction du nombre de précurseurs, jusqu'à une altération des mécanismes de différenciation et de fusion cellulaire. Afin de mieux comprendre les effets de l'HE, nous avons caractérisé la population des précurseurs des ostéoclastes dans la moelle osseuse. Nous avons constaté une réduction du nombre de cellules qui expriment l'intégrine CD11b (CD11b<sup>+</sup>), considérée comme un marqueur des cellules myéloïdes, qui sont les précurseurs des ostéoclastes (Quinn *et al.*, 1998). De plus, nous avons mesuré une tendance à la baisse (non significative toutefois) de l'expression de RANK (Figure 2.2), des récepteurs nécessaires à la différenciation des ostéoclastes. Ces résultats suggèrent que l'HE affecte négativement la population de cellules CD11b<sup>+</sup>. La réduction du nombre de cellules CD11b<sup>+</sup> peut provenir d'une diminution de leur survie ou d'une interférence avec leur différenciation à partir de cellules souches vers la voie myéloïde, sans affecter directement les récepteurs cellulaires impliqués dans l'ostéoclastogenèse. Des travaux futurs viseront à déterminer si l'HE induit l'apoptose des cellules CD11b<sup>+</sup>. Toutefois, cet effet est peu probable car l'HE induit l'expression/activité de l'enzyme anti-apoptotique

HO-1 (Immenschuh *et* Ramadori, 2000). De plus, aucun changement significatif de la densité des cellules en culture n'a été observé, et le traitement était plutôt associé à une augmentation du nombre de cellules mononucléées TRAP<sup>+</sup>, suggérant plutôt une inhibition de la fusion cellulaire.

L'ostéoclastogénèse est un processus de différenciation cellulaire qui implique la fusion des précurseurs (cellules myéloïdes CD11b<sup>+</sup>). Les facteurs RANKL et M-CSF produits par les cellules stromales de la moelle osseuse sont nécessaires et suffisants pour l'activation de l'ostéoclastogénèse. Ensemble, le M-CSF et le RANKL, lorsqu'ils se lient à leurs récepteurs M-CSFr et RANK à la surface des pré-ostéoclastes, induisent l'expression des gènes qui caractérisent la lignée des ostéoclastes, entre autres l'expression de la TRAP, la cathepsine K (CATK), le récepteur à la calcitonine et l'intégrine- $\beta^3$ , conduisant au développement des ostéoclastes matures (Suda *et al.*, 1999). Tout d'abord, les précurseurs sont stimulés par le facteur de croissance M-CSF et ils acquièrent le phénotype F4/80<sup>+</sup> (pré-ostéoclastes). Après cette étape, et par l'activation induite par RANKL, les cellules vont fusionner et deviennent multinucléées, pour acquérir le phénotype F4/80<sup>-</sup>, TRAP<sup>+</sup>, CTR<sup>+</sup>,  $\beta^3$ + caractéristique des ostéoclastes matures, qui pourront accomplir leur travail de remodelage de l'os (Boyle *et al.*, 2003). Nos résultats montrent que ce processus n'est pas entièrement bloqué et que les cellules progénitrices acquièrent un phénotype TRAP<sup>+</sup>, mais ne parviennent pas à fusionner.

L'effet de l'HE sur l'ostéoclastogénèse a été aussi étudié *in vitro*. Des cellules de la moelle osseuse de souris ont été traitées avec l'HE (25  $\mu$ g/ml). Nos résultats indiquent que l'ajout d'HE au milieu de culture diminue le nombre d'ostéoclastes issus des cellules de la moelle osseuse (Figure 2.3). Ces résultats suggèrent que l'HE inhibe directement la différenciation des progéniteurs des ostéoclastes, étant donné que la même concentration de cellules CD11b<sup>+</sup> a été utilisée pour les conditions témoin et traitées avec l'HE. Il reste à déterminer si l'HE affecte la survie des cellules. Nos résultats sont en accord avec les travaux de Swerina et collaborateurs qui indiquent une forte inhibition de la formation d'ostéoclastes obtenus de cultures de splénocytes exposés à l'HE (Zwerina *et al.*, 2005). Il est important de souligner que ces auteurs ont utilisé des cellules myéloïdes de la rate pour cette étude, et que



nos résultats *in vitro* corroborent aussi une inhibition importante de la différenciation de précurseurs myéloïdes de la moelle osseuse.

Par la suite, nous avons étudié les effets de l'HE sur les ostéoblastes, les cellules qui synthétisent la partie non-minérale des os (ostéoïde) et participent ensuite à la minéralisation de cette même matrice. Ainsi, des cellules de la moelle osseuse de souris injectées avec l'HE ont été prélevées et mises en culture afin d'évaluer la formation de colonies mésenchymateuses (précurseurs des ostéoblastes). Nos résultats indiquent une diminution de la formation de colonies mésenchymateuses des cultures provenant de souris traitées avec l'HE lorsque comparé aux souris non injectées (Fig. 2.4). Ces résultats indiquent que l'HE, en plus d'affecter les ostéoclastes, altère aussi les cellules mésenchymateuses qui vont se différencier ensuite en ostéoblastes.

Considérant que les cellules mésenchymateuses sont à l'origine de la formation des ostéoblastes, nous avons évalué *in vitro* l'effet de l'HE sur deux lignées cellulaires ostéoblastiques, la lignée humaine MG63 et la lignée murine MC3T3. Nos résultats indiquent que l'exposition à des concentrations croissantes d'HE tend à réduire la viabilité de ces cellules (Figure 2.5). De plus, l'HE réduit l'activité ALP des cellules MG-63, sans toutefois avoir d'effet sur cette activité dans les cellules MC3T3 (Figure 2.6). Ainsi, en plus d'avoir un effet sur les cellules mésenchymateuses, l'HE semble affecter la viabilité des cellules ostéoblastiques. De façon intéressante, l'HE inhibe l'activité ALP chez la lignée ostéoblastique humaine MG63 mais n'a pas d'effet sur celle des cellules MC3T3. Bien que cette différence puisse être reliée à l'espèce, il est à noter que les cellules MG63 sont des pré-ostéoblastes exprimant des niveaux importants d'activité de la phosphatase alcaline, tandis que les cellules MC3T3 sont des ostéoprogéniteurs en début de différenciation, et n'expriment que de faibles niveaux d'ALP. Ainsi, l'HE peut affecter différemment les cellules ostéoblastiques selon leur niveau de différenciation. Nos résultats sont en accord avec les travaux de Lin et collaborateurs (2010), qui ont rapporté une inhibition de la différenciation de cultures primaires d'ostéoblastes provenant de calvaria de rat, mis en évidence entre autres par une réduction de l'activité ALP.

Puisque l'HE est reconnu pour induire un SOx et des mécanismes de protection cellulaire, nous avons déterminé l'expression de l'HO-1 et les niveaux de ROS chez nos modèles cellulaires exposés à l'HE. Nous avons constaté une augmentation dose-dépendante des niveaux des protéines HO-1 dans les deux lignées cellulaires (Figure 2.7) et une augmentation de la production de ROS (Figure 2.8).

En plus de se différencier en ostéoblastes, les cellules mésenchymateuses peuvent devenir des adipocytes, myocytes et chondrocytes, (Pittenger *et al.*, 1999) selon les conditions d'induction, le milieu de culture et la présence de facteurs de différenciation caractéristiques. Dans ce contexte, Puri et collaborateurs ont rapporté que l'HE favorise la différenciation des cellules mésenchymateuses humaines en adipocytes, un effet qui est associé à la diminution de l'expression du facteur de régulation de la transcription sirtuin 1 (Puri *et al.*, 2012). Puisque les adipocytes et les ostéoblastes proviennent du même type cellules, ces résultats seraient en accord avec nos travaux où l'HE montre un effet négatif sur la voie de différenciation ostéoblastique, possiblement en faveur de la différenciation des cellules mésenchymateuses en adipocytes. Par contre, une autre étude plus récente ~~raporte~~ a apporté que l'augmentation des niveaux et de l'activité de HO-1, induite par des traitements au cobalt protoporphyrine IX (CoPP), inhibe la différenciation de cellules mésenchymateuses humaines en adipocytes, selon une régulation positive de la signalisation canonique Wnt (Vanella *et al.*, 2013). Les différences des résultats entre ces deux études pourraient être dues à l'agent inducteur de la HO-1 utilisé.

Les travaux de Barbagallo et collaborateurs (2010) ont indiqué que l'expression de l'HO-1 diminue au début de la différenciation ostéoblastique des cellules mésenchymateuses humaines, pour ensuite augmenter dans la deuxième phase de différenciation, ce qui laisse croire à un rôle complexe de HO-1 dans la différenciation ostéoblastique. L'augmentation de l'expression de HO-1 par le CoPP diminue l'adipogenèse et stimule l'ostéoblastogenèse, mis en évidence par une augmentation des niveaux des marqueurs ostéoblastiques tels l'ALP et la protéine BMP-2 (« Bone morphogenic protein-2 ») et une diminution des niveaux de PPAR $\gamma$  (« Peroxisome proliferator-activated receptor gamma »), connu comme un facteur de transcription de l'adipogenèse. (Barbagallo, 2010; Vanella *et al.*, 2010). Bien que le CoPP soit largement reconnu et utilisé comme un inducteur de l'HO-1, les travaux de Barbagallo

(2010) et de Vanella *et al* (2010) n'incluent pas l'utilisation d'inhibiteurs de l'HO-1 afin de confirmer son rôle clé dans la différenciation. Le CoPP et l'HE, sont deux protoporphyrines qui activent l'expression de HO-1, et la différence entre ces deux molécules se retrouve sur l'atome métallique. Le cobalt (Co) est plus stable et possède moins de capacité pro-oxydante que l'HE (Larsen *et al.*, 2012 ; Jeney *et al.*, 2002 ; Higdon *et al.*, 2012). Il est aussi possible que l'HE déclenche des effets cytotoxiques plus élevés et agisse de manière distincte sur la signalisation et la différenciation cellulaire.

En 2012, Gu et collègues ont confirmé le potentiel de l'HO-1 comme régulateur du processus de différenciation des ostéoblastes et des adipocytes, suite à l'activation d'HO-1 par la curcumine, un composé dérivé de *Curcuma longa*. (Gu *et al.*, 2012) Ces auteurs ont rapporté une hausse de la différenciation ostéoblastique et une diminution de la différenciation adipocytaire des cellules mésenchymateuses. Il convient de préciser que la dose de curcumine utilisée pour l'étude était trop faible pour induire des ROS (10µM à 15µM). En effet, les doses de curcumine capables d'induire des ROS ont été estimées égales ou supérieures à 25 µM ( McNally *et al.*, 2007), et cette réponse implique l'activation de la voie de la p38 MAPK, la même voie activatrice de la HO-1. Finalement, l'étude de Lin et collaborateurs (2010) indique que l'inhibition causée par l'HE sur la formation d'ostéoblastes à partir de cultures de cellules primaires est renversée par un inhibiteur de HO-1 (Lin *et al.*, 2010).

Nos résultats indiquent que l'exposition *in vitro* des cellules ostéoblastiques à l'HE s'accompagne d'une production de ROS (Figure. 2.8). Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) et le radical hydroxyle (HO\*), sont des espèces radicalaires et non radicalaires de l'oxygène formées par la réduction partielle de l'oxygène (Dröge, 2002). Les ROS cellulaires sont générés de façon endogène lors du processus de phosphorylation oxydative mitochondriale mais peuvent provenir de sources exogènes (Wang *et al.*, 2013). L'incapacité des systèmes anti-oxydants à neutraliser efficacement ces radicaux amène au SOx (Valko *et al.*, 2007). L'HO1 est activée par la voie Nrf2 et la signalisation cellulaire redox impliquant le Ref1, comme réponse au SOx oxydatif généré par les ROS et comme réponse protectrice suite aux dommages cellulaires (Ray *et al.*, 2012).

Chez les ostéoblastes, les facteurs de transcription forkhead box O (FoxO) participent à la protection cellulaire contre le SOx. Lorsque le système atteint son maximum de capacité de protection cellulaire, des ostéoblastes entrent en apoptose (Ambrogini *et al* 2008). L'observation de la cytotoxicité de l'HE *in vitro*, un processus dépendant de la dose, pourrait correspondre à une surcharge des mécanismes de protection, entraînant une réduction de l'activité ALP et ultimement la mort cellulaire. Par ailleurs, la protéine multifonctionnelle  $\beta$ -caténine joue un rôle important dans l'activation du facteur de transcription FoxO (Essers *et al* 2005), et il est possible que l'HE et/ou le SOx altère la signalisation associée à cette protéines et ainsi, compromette les mécanismes de protection cellulaire.

La capacité de l'HE d'induire des ROS est bien connue. Dans le contexte des cellules osteoblastiques, plusieurs études rapportent un lien entre le SOx, les ROS et une diminution de la différenciation (Arai *et al.*, 2007), une inhibition de la prolifération (Zhong *et al.*, 2009), l'induction de l'apoptose (Almeida *et al.*, 2010) et l'inhibition de la minéralisation (Mazière *et al.*, 2010). Ces études montrent comment l'incidence du SOx, créé par les ROS, influencent négativement les différentes fonctions des ostéoblastes. Nos résultats indiquent que l'HE a la capacité d'induire la production de ROS chez les cellules ostéoblastiques.

### 3. 2. CONCLUSION

Comme conclusion, notre étude démontre que l'HE crée un déséquilibre métabolique de l'os, en affectant autant l'ostéoblastogenèse que l'ostéoclastogenèse. L'hyperplasie de la moelle osseuse, associée à une forte activité érythropoïétique en combinaison avec le SOx généré par l'hème, défavorisent la formation osseuse et contribuent ainsi à une réduction de la masse osseuse. Nos résultats contribuent à mieux comprendre la relation entre le métabolisme de l'os et les maladies hémolytiques du sang.



## BIBLIOGRAPHIE

Ambrogini E., Almeida M., Martin-Millan M., Paik JH., Depinho RA., Han L., Goellner J., Weinstein RS., Jilka RL., O'Brien CA., Manolagas SC. (2010). FoxO-mediated defense against oxidative stress in osteoblasts is indispensable for skeletal homeostasis in mice. *Cell Metab.*, 11(2):136-46.

Almeida M., Han L., Ambrogini E., Bartell SM., Manolagas SC (2010). Oxidative stress stimulates apoptosis and activates NF-kappaB in osteoblastic cells via a PKCbeta/p66shc signaling cascade: counter regulation by estrogens or androgens. *Mol Endocrinol.*, 24(10), 2030-2037.

Anapliotou ML., Kastanias IT., Psara P., Evangelou EA., Liparaki M., Dimitriou P. (1995). The contribution of hypogonadism to the development of osteoporosis in thalassaemia major: new therapeutic approaches. *Clinical Endocrinology*, 42(3), 279-287.

Arai M., Shibata Y., Pugdee K., Abiko Y., Ogata Y. (2007). Effects of reactive oxygen species (ROS) on antioxidant system and osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. *IUBMB Life*, 59(1), 27-33.

Arruda MA., Rossi AG., De Freitas, Barja-Fidalgo, Graca-Souza AV. (2004). Heme inhibits human neutrophil apoptosis: involvement of phosphoinositide 3-kinase, MAPK, and NF-kB. *J. Immunol.*, 173(3), 2023-2030.

Ascenzi P., Fasano M. (2007). Heme-hemopexin: a 'chronosteric' heme-protein. *IUBMB Life*, 59(11), 700-708.

Balasubramanian K., Chandra J., Schroit AJ. (1997). Immune clearance of phosphatidylserine-expressing cells by phagocytes. The role of beta2-glycoprotein I in macrophage recognition. *J Biol Chem.*, 272(49), 31113-31117.

Baldanzi G., Traina F., Marques Neto JF., Oliveira Santos A., Ramos CD., Olalla ST. (2011). Low bone mass density is associated with hemolysis in brazilian patients with sickle cell disease. *Clinics (Sao Paulo)*, 66(5), 801-805.

Ballatori N., Krance SM., Marchan R., Hammond CL. (2009). Plasma membrane glutathione transporters and their roles in cell physiology and pathophysiology. *Mol Aspects Med.*, 30(1-2), 13-28.



- Barbagallo I., Vanella A., Peterson SJ., Kim DH., Tibullo D., Giallongo C., Vanella L., Parrinello N., Palumbo GA., Di Raimondo F., Abraham NG., Asprinio D. (2010). Overexpression of heme oxygenase-1 increases human osteoblast stem cell differentiation. *J Bone Miner Metab.*, 28(3), 276-288.
- Boyce BF., Xing L. (2008). Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys.*, 473(2), 139-146.
- Boyce BF., Yao Z, Xing L. (2009). Osteoclasts have multiple roles in bone in addition to bone resorption. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.*, 19(3), 171-180.
- Boyle WJ., Simonet WS., Lacey DL. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423(6937), 337-42.
- Carter K., Worwood M. (2007). Haptoglobin: a review of the major allele frequencies worldwide and their association with diseases. *Int J Lab Hematol.*, 29(2), 92-110.
- Dröge W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.*, 82(1), 47-95.
- Essers MA., de Vries-Smits LM., Barker N., Polderman PE., Burgering BM., Korswagen HC. (2005). Functional interaction between beta-catenin and FOXO in oxidative stress signaling. *Science*. 308(5725).
- Ferreira A., Balla J., Jeney V., Balla G., Soares MP. (2008). A central role for free heme in the pathogenesis of severe malaria: the missing link?. *J Mol Med (Berl.)*, 86(10), 1097-1111.
- Findlay D., Chehade M., Tsangari H., Neale S., Hay S., Hopwood B., Pannach S., O'Loughlin P., Fazzalari N. (2008). Circulating RANKL is inversely related to RANKL mRNA levels in bone in osteoarthritic males. *Arthritis Res Ther.*, 10(1), R2.
- Föller M., Huber SM., Lang F. (2008). Erythrocyte programmed cell death. *IUBMB Life*, 60(10), 661-668.
- Forman HJ., Torres M. (2002). Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *Am J Respir Crit Care Med.*, 166(12 Pt 2), S4-S8.
- Galanello R., Origa R. (2010). Beta-thalassemia. *Orphanet J Rare Dis.*, 5, 11.
- Glantschnig H., Fisher J E., Wesolowski G., Rodan G A., Reszka A A. (2003). M-CSF, TNF and RANK ligand promote osteoclast survival by signaling through mTOR/S6 kinase. *Cell Death and Differentiation*, 10(10), 1165-1177.

- Graham LS., Parhami F., Tintut Y., Kitchen CM., Demer LL., Effros RB. (2009). Oxidized lipids enhance RANKL production by T lymphocytes: implications for lipid-induced bone loss. *Clin Immuno.*, 133(2), 265-275.
- Gu Q., Cai Y., Huang C., Shi Q., Yang H. (2012). Curcumin increases rat mesenchymal stem cell osteoblast differentiation but inhibits adipocyte differentiation. *Pharmacogn Mag.*, 8(31):202-8.
- Hadjidakis DJ., Androulakis II. (2006). Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci.*, 1092, 385-396.
- Harteveld CL., Higgs DR. (2010). Alpha-thalassaemia. *Orphanet J Rare Dis.*, 5, 13.
- Higdon AN., Benavides GA., Chacko BK., Ouyang X., Johnson MS., Landar A., Zhang J., Darley-Usmar VM. (2012). Hemin causes mitochondrial dysfunction in endothelial cells through promoting lipid peroxidation: the protective role of autophagy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 302(7), H1394-409.
- Hodge JM., Collier FM., Pavlos NJ., Kirkland MA., Nicholson GC. (2011). M-CSF potently augments RANKL-induced resorption activation in mature human osteoclasts. *PLoS One*, 6(6), e21462.
- Holz JD., Sheu TJ., Drissi H., Matsuzawa M., Zuscik MJ., Puzas JE. (2007). Environmental agents affect skeletal growth and development. *Birth Defects Res C Embryo Today.*, 81(1), 41-50.
- Immenschuh S., Ramadori G. (2000). Gene regulation of heme oxygenase-1 as a therapeutic target. *Biochem Pharmacol.*, 60(8), 1121-8.
- Jeney V., Balla J., Yachie A., Varga Z., Vercellotti GM., Eaton JW., Balla G. (2002). Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood*, 100(3), 879-87.
- Jomova K., Valko M. (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283(2-3), 65-87.
- Kapinas K., Delany AM. (2011). MicroRNA biogenesis and regulation of bone remodeling. *Arthritis Res Ther.*, 13(3):220.
- Kearns AE., Khosla S., Kostenuik PJ. (2008). Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev.*, 29(2), 155-192.
- Kobayashi T., Kronenberg H. (2005). Minireview: transcriptional regulation in development of bone. *Endocrinology*, 146(3), 1012-1017.

- Kohne E. (2011). Hemoglobinopathies: clinical manifestations, diagnosis, and treatment. *Dtsch Arztebl Int.*, 108(31-32), 532-540.
- Korkmaz U., Korkmaz AN., Erkan ME. (2013). Anemia, celiac disease and low bone mass. *Eur J Intern Med.*, 24(1), e2.
- Kumar S., Bandyopadhyay U (2005). Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol Lett.*, 157(3), 175-188.
- Larsen R, Gouveia Z, Soares MP, Gozzelino R. (2012). Heme cytotoxicity and the pathogenesis of immune-mediated inflammatory diseases. *Front Pharmacol.* 4;3:77.
- Laudisio A., Marzetti E., Pagano F., Bernabei R., Zuccalà G. (2009). Haemoglobin levels are associated with bone mineral density in the elderly: a population-based study. *Clin Rheumatol.*, 28(2), 145-51.
- Lin TH., Tang CH., Hung SY., Liu SH., Lin YM., Fu WM., Yang RS. (2010). Upregulation of heme oxygenase-1 inhibits the maturation and mineralization of osteoblasts. *J Cell Physiol.*, 222(3), 757-768.
- Mahachoklertwattana P., Pootrakul P., Chuansumrit A., Choubtum L., Sriphrapadang A., Sirisriro R., Rajatanavin R. (2006). Association between bone mineral density and erythropoiesis in Thai children and adolescents with thalassemia syndromes. *J Bone Miner Metab.*, 24(2), 146-152.
- Mazière C., Savitsky V., Galmiche A., Gomila C., Massy Z., Mazière JC. (2010). Oxidized low density lipoprotein inhibits phosphate signaling and phosphate-induced mineralization in osteoblasts. Involvement of oxidative stress. *Biochim Biophys Acta.*, 1802(11):1013-9.
- McNally SJ., Harrison EM., Ross JA., Garden OJ., Wigmore SJ. (2007). Curcumin induces heme oxygenase 1 through generation of reactive oxygen species, p38 activation and phosphatase inhibition. *Int J Mol Med.*, (1):165-72.
- Mintzer DM., Billet SN., Chmielewski L. (2009). Drug-induced hematologic syndromes. *Adv Hematol.* 2009:495863.
- Mizukami J., Takaesu G, Akatsuka H., Sakurai H., Ninomiya-Tsuji J., Matsumoto K., Sakurai N. (2002). Receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) activates TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase through a signaling complex containing RANK, TAB2, and TRAF6. *Mol Cell Biol.*, 22(4), 992-1000.

Moreau R., Tshikudi Malu D., Dumais M., Dalko E., Gaudreault V., Roméro H., Martineau C., Kevorkova O., Dardon JS., Dodd EL., Bohle DS., Scorza T. (2012). Alterations in bone and erythropoiesis in hemolytic anemia: comparative study in bled, phenylhydrazine-treated and Plasmodium-infected mice. *PLoS One*, 7(9), e 46101.

Nielsen MJ., Møller HJ., Moestrup SK. (2010). Hemoglobin and heme scavenger receptors. *Antioxid Redox Signal.*, 12(2), 261-273.

Ollinger R., Wang H., Yamashita K., Wegiel B., Thomas M., Margreiter R., Bach FH. (2007). Therapeutic applications of bilirubin and biliverdin in transplantation. *Antioxid Redox Signal.*, 9(12), 2175-2185.

Otterbein LE., Bach FH., Alam J., Soares M., Tao Lu H., Wysk M., Davis RJ., Flavell RA, Choi AM (2000). Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med.*, 6(4), 422-428.

Pae HO., Chung HT. (2009). Heme oxygenase-1: its therapeutic roles in inflammatory diseases. *Immune Netw*, 9(1), 12-19.

Pittenger MF., Mackay AM., Beck SC., Jaiswal RK., Douglas R., Mosca JD., Moorman MA., Simonetti DW., Craig S., Marshak DR. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411), 143-7.

Phumalaa N., Porasuphatanaa S., Unchernaa S., Pootrakulb P., Fucharoenb S., Chantharaksa U. (2003). Hemin: A Possible Cause Of Oxidative Stress In Blood Circulation Of B-Thalassemia/Hemoglobin E Disease. *Free Radical Research*, 37(2), 129-135.

Puri N, Sodhi K., Haarstad M., Kim DH., Bohinc S., Foglio E., Favero G., Abraham NG. (2012). Heme induced oxidative stress attenuates sirtuin1 and enhances adipogenesis in mesenchymal stem cells and mouse pre-adipocytes. *J Cell Biochem*. 113(6):1926-35.

Quinn JM., Neale S., Fujikawa Y., McGee JO., Athanasou NA. (1998). Human osteoclast formation from blood monocytes, peritoneal macrophages, and bone marrow cells. *Calcif Tissue Int.*, 62(6), 527-31.

Quinn MT., Schepetkin IA. (2009). Role of NADPH oxidase in formation and function of multinucleated giant cells. *J Innate Immun.*, 1(6), 509-526.

Ray PD., Huang BW., Tsuji Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*, 24(5), 981-90.

Regan RF., Chen J., Benvenisti-Zarom L. (2004). Heme oxygenase-2 gene deletion attenuates oxidative stress in neurons exposed to extracellular hemin. *BMC Neurosci.*, 5, 34.

Sánchez-Rodríguez M., Ruiz-Ramos M., Correa- Muñoz E., Mendoza-Núñez VM. (2007). Oxidative stress as a risk factor for osteoporosis in elderly Mexicans as characterized by antioxidant enzymes. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 8, 124.

Sarady-Andrews JK., Liu F., Gallo D., Nakao A., Overhaus M., Ollinger R., Choi AM., Otterbein LE. (2005). Biliverdin administration protects against endotoxin-induced acute lung injury in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, 289(6), L1131-L1137.

Sarrai M., Duroseau H., D'Augustine J., Moktan S., Bellevue R. (2007). Bone mass density in adults with sickle cell disease. *J Haematol.*, 136(4), 666-672.

Schoppet M., Al-Fakhri N., Franke FE., Katz N., Barth PJ., Maisch B., Preissner KT., Hofbauer LC. (2004). Localization of osteoprotegerin, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand in Mönckeberg's sclerosis and atherosclerosis. *J Clin Endocrinol Metab.*, 89(8), 4104-4112.

Seixas E., Ostler D. (2005). Plasmodium chabaudi chabaudi (AS): differential cellular responses to infection in resistant and susceptible mice. *Exp Parasitol.*, 110(4), 394-405.

Simonet WS., Lacey DL., Dunstan CR., Kelley M., Chang MS., Lüthy R., Nguyen HQ., Wooden S., Bennett L., Boone T., Shimamoto G., DeRose M., Elliott R., Colombero A., Tan HL., Trail G., Sullivan J., Davy E., Bucay N., Renshaw-Gegg L., Hughes TM., Hill D., Pattison W., Campbell P., Sander S., Van G., Tarpley J., Derby P., Lee R., Boyle WJ. (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 89(2), 309-319.

Soares MP., Seldon MP., Gregoire IP., Vassilevskaia T., Berberat PO., Yu J., Tsui TY., Bach FH. (2004). Heme oxygenase-1 modulates the expression of adhesion molecules associated with endothelial cell activation. *J Immunol.*, 172(6), 3553-3563.

Srinivasan S., Koenigstein A., Joseph J., Sun L., Kalyanaraman B., Zaidi M., Avadhani NG. (2010). Role of mitochondrial reactive oxygen species in osteoclast differentiation. *Ann N Y Acad Sci.*, 1192, 245-252.

Suda T., Takahashi N., Udagawa N., Jimi E., Gillespie MT., Martin TJ. (1999). Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev.*, 20(3), 345-57.



- Suh GY., Jin Y., Yi AK., Wang XM., Choi AM. (2006). CCAAT/enhancer-binding protein mediates carbon monoxide-induced suppression of cyclooxygenase-2. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 35(2), 220-226.
- Touyz RM. (2004). Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension*, 44(3), 248-252.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin MT., Mazur M., Telser J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.*, 39(1), 44-84.
- Vanella L., Sodhi K., Kim DH., Puri N., Maheshwari M., Hinds TD Jr., Bellner L., Goldstein D., Peterson SJ., Shapiro JL., Abraham NG. (2013). Increased heme-oxygenase 1 expression in mesenchymal stem cell-derived adipocytes decreases differentiation and lipid accumulation via upregulation of the canonical Wnt signaling cascade. *Stem Cell Res Ther.*, 4(2):28.
- Vanella L., Kim DH., Asprinio D., Peterson SJ., Barbagallo I., Vanella A., Goldstein D., Ikehara S., Kappas A., Abraham NG. (2010). HO-1 expression increases mesenchymal stem cell-derived osteoblasts but decreases adipocyte lineage. *Bone*. 46(1):236-43.
- Voskaridou E., Christoulas D., Xirakia C., Varvagiannis K., Boutsikas G., Bilalis A., Kastiritis E., Papatheodorou A., Terpos E. (2009). Serum Dickkopf-1 is increased and correlates with reduced bone mineral density in patients with thalassemia-induced osteoporosis. Reduction post-zoledronic acid administration. *Haematologica*, 94(5), 725-728.
- Walker JM. (1994). The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods Mol Biol.*, 32, 5-8.
- Wang X., Fang H., Huang Z., Shang W., Hou T., Cheng A., Cheng H. (2013). Imaging ROS signaling in cells and animals. *J Mol Med (Berl)*, 91(8), 917-27.
- Walter PB., Fung EB., Killilea DW., Jiang Q., Hudes M., Madden J., Porter J., Evans P., Vichinsky E., Harmatz P. (2006). Oxidative stress and inflammation in iron-overloaded patients with beta-thalassaemia or sickle cell disease. *Br J Haematol*, 135(2), 254-263.
- Wilson SR., Peters C., Saftig P., Brömme D. (2009). Cathepsin K activity-dependent regulation of osteoclast actin ring formation and bone resorption. *J Biol Chem.*, 284(4), 2584-2592.
- Winterbourn CC. (1985). Free-radical production and oxidative reactions of hemoglobin. *Environ Health Perspect*, 64, 321-330.



World Health Organization. «Iron deficiency anemia: assessment, prevention, and control. A guide for programme managers». Geneva, WorldHealth Organization, 2001 (WHO/NHD/01.3).

World Health Organization. «The World Health Report 2002: Reducing risks, promoting healthy life». Geneva, World Health Organization 2002.

Zwerina J., Tzima S., Hayer S., Redlich K., Hoffmann O., Hanslik-Schnabel B., Smolen J., Kollias G., Schett G. (2005). Heme oxygenase 1 (HO-1) regulates osteoclastogenesis and bone resorption. *FASEB J.*, 19(14), 2011-2013.

Zhong ZM., Bai L., Chen JT. (2009). Advanced oxidation protein products inhibit proliferation and differentiation of rat osteoblast-like cells via NF-kappaB pathway. *Cell Physiol Biochem.*, 24(1-2), 105-114.